

<https://helda.helsinki.fi>

---

## Tioperamidin vaikutus etanolin stimuloimaan dopamiinin vapautumiseen accumbens-tumakkeessa

Ojanen, Sami

2000

---

Ojanen , S 2000 , ' Tioperamidin vaikutus etanolin stimuloimaan dopamiinin vapautumiseen accumbens-tumakkeessa ' .

---

<http://hdl.handle.net/10138/229409>

---

acceptedVersion

---

*Downloaded from Helda, University of Helsinki institutional repository.*

*This is an electronic reprint of the original article.*

*This reprint may differ from the original in pagination and typographic detail.*

*Please cite the original version.*

Sami Ojanen  
Antti Korpin tie 4 B 10  
00600 HELSINKI  
Puh. 040 509 4771

Pro Gradu

21.1.2000

---

**TIOPERAMIDIN VAIKUTUS ETANOLIN STIMULOIMAAN  
DOPAMIININ VAPAUTUMISEEN ACCUMBENS-TUMAKKEESSA**

HELSINGIN YLIOPISTO  
Biotieteiden laitos  
Eläinfysiologian osasto

**SISÄLLYSLUETTELO****TIIVISTELMÄ****SISÄLLYSLUETTELO**

<b>KUVAT.....</b>	<b>6</b>
<b>KÄYTETYT LYHENTEET.....</b>	<b>7</b>
 <b>1</b>	
<b>JOHDANTO .....</b>	<b>8</b>
 <b>2</b>	
<b>PÄIhteidenkäytön taustat ja pitkäaikainen käyttö.....</b>	<b>10</b>
 2.1	
Mielihyväjärjestelmä.....	10
 2.2	
Addiktiivisen päihteidenkäytön tunnusmerkit.....	11
 2.3	
Päihteidenkäytön aiheuttamat muutokset aivoissa.....	11
 2.4	
Pitkäaikainen päihteidenkäyttö ja vieroitusoireet.....	12
 2.5	
Alkoholiriippuvuuden lääkinnälliset apukeinot .....	12
 2.6	
Päihderiippuvuuden geneettinen tausta.....	12
 <b>3</b>	
<b>KÄYTÖN ALOITTAMISTA JA JATKAMISTA EDISTÄVÄT TEKIJÄT .....</b>	<b>14</b>
 3.1	
Positiiviset ja negatiiviset vahvistavat tekijät.....	14
 3.2	
Vahvistavien tekijöiden tutkimiseen käytetyt menetelmät.....	14
 <b>4</b>	
<b>DOPAMIINI JA SEN MERKITYS PÄIhteidenkäytössä.....</b>	<b>16</b>
 4.1	
Dopamiinin vaikutus.....	16

4.2	
Dopamiinin metabolia.....	16
4.2.1	
Dopamiinin anabolia.....	16
4.2.2	
Dopamiinin vapautuminen ja katabolia.....	17
4.3	
Dopamiinireseptorit.....	17
4.3.1	
D <sub>1</sub> - ja D <sub>2</sub> -perheen reseptorit.....	17
4.3.2	
Auto- ja heteroreseptorit.....	18
4.4	
Dopamiinin erityis.....	18
4.5	
Dopamiinin merkitys päihteiden väärinkäytössä.....	18
4.5.1	
Eri päihteiden vaikutuskohteet.....	19
4.5.2	
Päihteidenkäytöstä johtuvat käyttäytymismuutokset.....	19
4.6	
Annostelutavan ja -paikan vaikutus dopamiinin erityykseen.....	19
4.7	
Dopamiinin määrän tutkimiseen käytetyt menetelmät.....	20
4.7.1	
Voltammetria.....	20
4.7.2	
Mikrodialyysi.....	20
<b>5</b>	
<b>HISTAMIINI.....</b>	<b>22</b>
5.1	
Histamiinin tehtävä.....	22
5.2	
Histamiinireseptorit.....	22
5.2.1	
Histamiini H <sub>3</sub> -reseptori.....	22

5.2.2	
Tioperamidi .....	23
5.3	
Histamiinin ja etanolin metabolian yhteneväisyydet.....	23
<b>6</b>	
<b>SEROTONIINI.....</b>	<b>25</b>
6.1	
Serotoniinijärjestelmä.....	25
6.2	
Serotoniinin metabolia.....	25
6.3	
Serotoniinireseptorit.....	25
6.4	
Serotoniinin merkitys päihteidenkäytössä.....	26
<b>7</b>	
<b>MUIDEN VÄLITTÄJÄAINEIDEN MERKITYS PÄIHTEIDENKÄYTÖSSÄ.....</b>	<b>27</b>
7.1	
Opioidijärjestelmä.....	27
7.2	
GABA-järjestelmä.....	27
7.3	
Glutamaattijärjestelmä.....	27
<b>8</b>	
<b>TYÖN TARKOITUS.....</b>	<b>29</b>
<b>9</b>	
<b>AINEISTO JA MENETELMÄT.....</b>	<b>30</b>
9.1	
Käytetyt eläimet.....	30
9.2	
Leikkaus.....	30
9.3	
Mikrodialyysin suorittaminen.....	31
9.4	
Aivoleikkeiden teko.....	32
9.5	
Näytteiden analysointi.....	32

9.6	
Veren etanolipitoisuuden määrittäminen.....	33
9.7	
Tulosten tilastollinen testaus.....	33
<b>10</b>	
<b>TULOKSET.....</b>	<b>34</b>
10.1	
Saliini + saliini.....	37
10.2	
Saliini + Etanoli.....	37
10.3	
Tioperamidi + saliini.....	39
10.4	
Tioperamidi + etanoli.....	39
10.5	
Ryhmienväliset erot.....	40
10.5.1	
Dopamiini.....	40
10.5.2	
DOPAC.....	40
10.5.3	
HVA.....	40
10.5.4	
5-HIAA.....	
10.6	
Mitattujen aineiden todelliset pitoisuudet.....	41
<b>11</b>	
<b>TULOSTEN TARKASTELU.....</b>	<b>42</b>
11.1	
Etanolin vaikutus.....	42
11.2	
Tioperamidin vaikutus.....	42
11.2.1	
Tioperamidin vaikutus eläinten liikeaktiivisuuteen.....	43
11.2.2	
Tioperamidin vaikutus dopaminergiseen viestinvälitykseen.....	43

11.3	
Veren alkoholipitoisuudet.....	44
11.4	
Loppuyhteenvedo.....	45
12	
<b>KIITOKSET.....</b>	<b>46</b>
13	
<b>LÄHTEET.....</b>	<b>47</b>

**KUVAT**

<b>Kuva 1.</b>	Mesolimbainen dopamiinirata.....	10
<b>Kuva 2.</b>	Dopamiinin, DOPAC:in, HVA:n ja 3-MT:n metabolia.....	17
<b>Kuva 3.</b>	Histaminergisten neuronien sijainti ja niiden lähettämät efferentit.....	22
<b>Kuva 4.</b>	Tioperamidin rakenteellinen kaava.....	23
<b>Kuva 5.</b>	Histamiinin metabolia.....	24
<b>Kuva 6.</b>	Serotoniinin metabolia.....	25
<b>Kuva 7.</b>	Mikrodialyysilaitteiston kokoonpano.....	25
<b>Kuva 8.</b>	Kuva tyypillisestä koettimen paikan tarkistamiseen käytetystä aivoleikkeestä....	26
<b>Kuva 9a.</b>	Tioperamidin ja etanolin vaikutus dopamiinin pitoisuuteen.....	35
<b>Kuva 9b.</b>	Tioperamidin ja etanolin vaikutus DOPAC:in pitoisuuteen .....	35
<b>Kuva 9c.</b>	Tioperamidin ja etanolin vaikutus HVA:n pitoisuuteen .....	36
<b>Kuva 9d.</b>	Tioperamidin ja etanolin vaikutus 5HIAA:n pitoisuuteen .....	36
<b>Kuva 8.</b>	Tioperamidin vaikutus vapaaehtoiseen alkoholinkäyttöön AA-rotilla.....	42



**KÄYTETYT LYHENTEET**

3-MT	3-metyylityramiini
5-HIAA	5-hydroksi-indolietikkahappo l. serotoniini
AA	Alko Alcohol, rottakanta
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-isoxazolipropionihappo
COMT	katekoli-O-metyylitransferaasi
DA	dopamiini
DOPAC	dihydroksifenyylietikkahappo
GABA	gamma-aminovoihappo
ICSS	aivojensisäinen itsestimulaatio, Intra Cranial Self Stimulation
HVA	homovanilliinihappo
HPLC	korkean suorituskyvyn nestekromatografia, High Performance Liquid Chromatography
i.p.	intraperitoneaalinen
i.v.	intravenoosinen
L-DOPA	dihydroksifenyylialaniini
MAO	monoamiinioksidaasi
mFCX	aivokuoren mediaalinen etuosa, Medial Frontal Cortex
NAcc	accumbens-tumake, <i>Nucleus Accumbens</i>
NMDA	N-metyyli-D-aspartaatti
VTA	ventraalinen tegmentum, Ventral Tegmental Area

# 1

## JOHDANTO

Ihminen on jo tuhansia vuosia käyttänyt päihteitä, kuten etanolia, kokaiinia, kofeiinia ja nikotiinia, kuitenkin vasta nyt on alettu ymmärtää mikä on pohjimmiltaan syynä näiden aineiden käyttöön. Päihteiden pitkäaikainen käyttö rappeuttaa terveyden ja voi johtaa lopulta kuolemaan, mutta silti niiden käyttäjiä on valtavasti. Miedompia päihteitä ja huumeita tai sellaisiksi lain mukaan nimitettäviä, kuten tupakkaa ja alkoholia, käytetään lähes kaikkialla myös laillisesti. Nykypäivänä myös erilaisia päihteitä on enemmän ja entistä vahvempia aineita käytetään väärin. Päihteiden haittavaikutuksista ollaan varsin hyvin selvillä, mutta henkisen ja fyysisen riippuvuuden syntymekanismit eivät kaikilta osiltaan ole vielä tiedossa. Näiden tunteminen olisi erittäin tärkeää, jotta väärinkäyttäjien vieroituksella olisi paremmat edellytykset ja pystyttäisiin estämään jo kuiville päässeiden uudelleen päihteidenkäyttöön retkahtaminen.

Päihteidenkäytön palkitsevuuden taustalla ajatellaan nykyisin olevan samojen aivojen osien, jotka välittävät monista luonnollisista ärsykkeistä, kuten syömisestä, juomisesta ja seksistä, saatavaa mielihyvän tunnetta (Nurmi 1998, Wise 1996, Di Chiara 1997). Muuttamalla aivojen mielihyvää tuottavien mekanismien toimintaa, päihteet voivat aiheuttaa pitkäaikaisen riippuvuuden niiden käyttöön. Dopamiinin on osoitettu olevan ensisijaisen tärkeä tämän järjestelmän toiminnassa. Myös monilla muilla välittäjäaineilla on osansa näihin tapahtumiin. Aivojen perusmekanismien tunteminen on jo sinällään mielenkiintoista ja tärkeää, mutta tutkimuksen tavoitteena on etsiä myös keinoja pitkäaikaisten päihteidenkäyttäjien vieroittamiseen. Uudet tutkimusmenetelmät, kuten mikrodialyysi, ovat mahdollistaneet entistä tarkemman tiedon hankkimisen ja niiden avulla on kenties jo pian mahdollista muodostaa yhtenäinen teoria päihteiden ja mielihyväjärjestelmän välisistä vuorovaikutuksista ja sitä kautta mahdollistaa entistä tehokkaampien hoitokeinojen kehittäminen.

Riippuvuuden syntyyn liittyy kahdenlaisia vahvistavia tekijöitä; positiivisia ja negatiivisia. Positiiviset vahvistavat tekijät ovat samoja, joita koetaan myös luonnollisten yksilön selviämiseen liittyvien toimintojen yhteydessä (Self 1998, Koob et al. 1997, Wise et al. 1981). Samanlaista mielihyvää, jota tunnetaan esimerkiksi syömisestä yhteydessä, tuottavat myös monet päihteet. Negatiivisten vahvistavien tekijöiden olemassaolosta tai merkityksestä tutkijat eivät ole aivan yhtä yksimielisiä. Näiden tekijöiden taustalla ovat mm. pitkäaikaisen päihteidenkäytön lopettamisesta aiheutuvat vieroitusoireet, joita karkotettaessa on hyvin suuri todennäköisyys aloittaa päihteidenkäyttö uudelleen (Di Chiara 1995, Self 1998).

Viime aikoina accumbens-tumakkeen (*Nucleus Accumbens*, NAcc) merkityksestä mielihyväjärjestelmän osana ja dopamiinin osuudesta tämän järjestelmän toimintaan on esitetty myös muutamia toisistaan hieman poikkeavia teorioita. Useat tutkimukset ovat kiistatta osoittaneet, että esimerkiksi etanoli nostaa dopamiinin ja sen metaboliittien pitoisuutta accumbens-tumakkeessa (Honkanen et al. 1997 ja 1994, Kiianmaa et al. 1995, Weiss et al. 1993). Minkälainen mekanismi tämän lisääntyneen erityksen takana on ei ole yhtä helposti havaittavista pelkistä välittäjäainepitoisuuksien mittauksista. Lisääntyneen dopamiinin erityksen taustalla etanolin tapauksessa on todennäköisesti usean eri järjestelmän kautta välittyviä tapahtumia. Näitä saattavat olla esimerkiksi etanolin

inhibitoriset vaikutukset ventraalisen tegmentumin (VTA) toimintaan tai opioidijärjestelmän kautta syntyvät muutokset hermosolujen viestinvälityksessä. Dopamiinin erityksen kasvamisen tarkoitus saattaa lopulta olla vaikkapa eläimen motivaatioasteen ja huomionvarkyyvyn nostaminen kulloistenkin ympäristön ärsykkeiden vaatimalle tasolle. Tasolle, jossa eläimen mahdollisuudet selviytyä ja käyttää tarjolla olevat resurssit tehokkaasti on huipussaan.

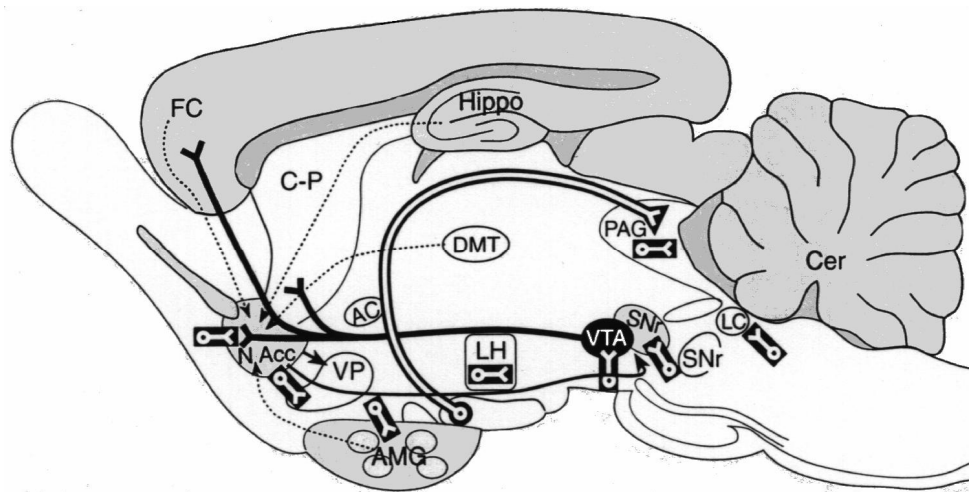
## 2

## PÄIhteidenkäytön taustat ja pitkäaikainen käyttö

## 2.1

## Mielihyväjärjestelmä

Mielihyväjärjestelmä koostuu joukosta limbiseen järjestelmään kuuluvia aivojen tumakkeita ja niiden välisistä eri välittäjäaineita käyttävistä yhteyksistä. Nämä tumakkeet sijaitsevat aivojen alaosissa ja ovat kehityksellisesti hyvin vanhaa perua. Keskeisimpänä osana on VTA-alueelta (lähinnä alueelta A10) accumbens-tumakkeeseen johtava dopamiinirata, josta haarautuu yhteyksiä myös isoavokuorelle (Wise 1978). VTA-alueen dopaminergiset solut saavat eksitoivia signaaleja asetyylikoliinireseptoreidensa kautta ja niiden toimintaa inhiboidaan gamma-aminovoihapon (GABA) avulla (Kuva 1). Asetyylikoliinireseptoreiden kautta välittyy myös nikotiinin kyky lisätä dopamiinin määrää accumbens-tumakkeessa. Morfiinin vaikutus taas kohdistuu GABAergisiin soluihin niiden toimintaa heikentävästi, jolloin mesolimbisen dopamiinirata toimii tehokkaammin. Accumbens-tumakkeessa dopamiini vaikuttaa ainakin kolmen eri reseptorin välityksellä, joilla kullakin on havaittu olevan merkitystä päihteiden palkitsevuudessa. Accumbensin tasolla vaikuttavia päihteitä ovat ainakin amfetamiini, kokaiini ja heroini. Accumbens-tumake saa eksitoivia signaaleja myös isoavokuorelta sekä hippokampuksesta ja lisäksi sieltä on GABAergistä takaisinkytkentää ainakin VTA-alueelle. (Wise 1996, Wise ja Bozarth 1981).



Kuva 1.

**Mesolimbisen dopamiinirata.** Mesolimbisen dopamiinirata on kuvassa merkitty paksulla tummalla viivalla. Accumbens-tumakkeen aktiivisuutta säätelevistä limbisen järjestelmän aivoalueista, kuten amygdalasta (AMG), frontaalaiselta aivokuorelta (FC) ja hippokampuksesta (Hippo), lähtevät afferentit on merkitty katkoviivalla. Accumbens-tumakkeesta lähtevät efferentit on kuvattu tummalla viivalla ja eräitä keskeisiä opioidipeptidirateja on merkitty valkoisella. Harmaalla merkityillä alueilla alkoholin vaikutuksille keskeisten GABA<sub>A</sub>-reseptorien määrä on suuri. C-P = caudatus-putamen, AC = commissura anterior, VP = ventraalinen pallidum, DMT = dorsomedialinen talamus, LH = lateraalinen hypotalamus, PAG = aivojen keskeinen harmaa aine, SNr = substantia nigra, LC = locus caeruleus, Cer = cerebellum. (Kiianmaa ja Hyytiä 1998)

## 2.2

### Addiktiivisen päihteidenkäytön tunnusmerkit

Käsiteellä päihde tarkoitetaan kaikkia aineita joiden käyttöön voi kehittyä pakonomainen tarve saada niitä lisää ja joiden käyttö johtaa vakaviin terveydellisiin haittoihin. Yleisimmin käytetyt päihteet voidaan jakaa alkoholiin ja huumeisiin, joihin kuuluvat mm. kokaiini, amfetamiini, nikotiini ja heroini. Näiden aineiden addiktiivinen vaikutus vaihtelee huomattavasti samoin kuin niiden mielihyvää tuottava vaikutuskin. Yhteistä niille on kyky aikaansaada riippuvuus niiden käyttöön.

Varsin moni meistä tupakoi tai juo alkoholia toisinaan olematta silti mielestään riippuvainen näistä aineista. Myöskin näiden aineiden vaarat ja käytön riskit ovat yleisesti tiedossa. Aineiden keskeisestä merkityksestä kulttuurissamme ja niiden riippuvuutta aiheuttavista ominaisuuksista huolimatta suurin osa käyttäjistä hallitsee käyttönsä. Addikteilla sen sijaan päivittäiset toimet keskittyvät pelkästään siihen kuinka hankkia päihteensä lopun ajan kuluessa niiden käytöstä johtuvan tilan vallassa. Päihteidenkäytön seurauksena sekä sosiaaliset suhteet että työelämä kärsivät ja ovat edelleen edesauttamassa pitkäaikaisen käytön jatkumista. Alkuunpanevana voimana päihteidenkäytölle saattavat olla geneettiset, psykososiaaliset ja ympäristölliset tekijät, mutta kun käyttö on aloitettu voi itse päihde edistää ja voimistaa päihdehakuista käyttäytymistä, jopa kokonaan ilman edellä mainittuja tekijöitä (Roberts ja Koob 1997). Tämä vaikutus saattaa välittyä joko tavanomaisten mielihyvää tuottavien toimintojen, kuten syömisen ja juomisen tapaan, mutta päihteillä on myös suora vaikutus aivoihin esim. tietyn reseptorin välityksellä. Etanolia voidaan nauttia toistuvasti sen maun takia, mutta pitkäaikaisen käytön seurauksena myös erilaiset vahvistavat tekijät ylläpitävät juomista (Di Chiara 1995). Yhtenä toistuvan päihteidenkäytön merkinä voidaan pitää myös pahojen vieroitusoireiden syntyä lopetettaessa niiden käyttö (Koob 1998).

## 2.3

### Päihteidenkäytön aiheuttamat muutokset aivoissa

Päihteiden aiheuttamat muutokset aivoissa ja niiden johdosta syntyvät käyttäytymismuutokset vaihtelevat sen mukaan onko kyseessä akuutti kerta-altistus vai krooninen, pitkäaikainen käyttö. Normaalisti aivojen inhibitoristen ja eksitatoristen mekanismien välillä vallitsee tasapaino. Tätä tasapainoa ylläpitää useiden hermosolujen ja niiden vapauttamien välittäjäaineiden välinen vuorovaikutus. Akuutti altistus päihteelle muuttaa usein tätä tasapainoa jompaan kumpaan suuntaan, päästäten vallalle joko inhibitorisen tai eksitatorisen välityksen, esimerkiksi etanolin tapauksessa inhibitoriset mekanismit tulevat vallitseviksi. Tämä johtuu lähinnä GABA-välitteisen inhibition voimistumisesta (Roberts ja Koob 1997).

Pitkäaikaisen käytön seurauksena aivot pyrkivät kompensoimaan aiheutuneen muutoksen. Etanolin ollessa kyseessä tämä tapahtuu pienentämällä inhibitorista ja lisäämällä eksitatorista välitystä. Näin saavutetaan uudenlainen tasapaino, jossa päihteiden tuomat muutokset on otettu huomioon. (Valenzuela 1997). Tätä tapahtumaa kutsutaan toleranssin syntymiseksi. Tämä kompensaatio johtaa kuitenkin siihen, että käyttäjän

tavoittelema vaikutus jää laimeammaksi. Tällöin päihteen määrää on lisättävä, jotta saavutettaisiin yhtä voimakas vaikutus kuin aikaisemmin. Jos päihteen käyttö lopetetaan näiden kompensaatiomekanismien tapahduttua, on seurauksena jälleen uusi epätasapaino. Tämän epätasapainon seurauksena koetaan vieroitusoireita, joiden aikana elimistö yrittää jälleen sopeutua uuteen tilanteeseen (Kiianmaa ja Hyytiä 1998, Valenzuela 1997, Wise 1996). Vieroitusoireiden aikana ainakin kokaiinin, morfiinin, amfetamiinin ja etanolin tapauksessa onkin havaittu akuuttiin altistukseen verrattuna päinvastaisia muutoksia *accumbens*-tumakkeen dopamiinipitoisuuksissa (Rossetti 1992). Epätasapaino välittäjäaineiden määrissä saattaa olla jopa jonkin asteisten aivovaurioiden aiheuttajana. Esimerkiksi lopetettaessa ja aloitettaessa etanolinkäyttö toistuvasti, voi seurauksena olla liian voimakkaan kalsiuminvirtauksen aiheuttamien solun toiminnan muutosten aikaansaama aivovaurio (Valenzuela 1997).

## 2.4

### Pitkäaikainen päihteenkäyttö ja vieroitusoireet

Pitkäaikaista päihteenkäyttöä seuraavat vieroitusoireet ovat moninaisia; kohonnut verenpaine, sydämen lyöntitiheyden kasvu, erilaiset kohtaukset, hallusinaatiot, unettomuus ja mielentilan muutokset (Self 1998, Valenzuela 1997). Fyysiset oireet ovat alkuvaiheessa usein vaikeimpia, mutta niiden vaikutusaika on lyhyempi kuin henkisten. Fyysisiä oireita paetakseen on helppo aloittaa käyttö uudestaan. Henkiset vieroitusoireet sisältävät myös laajan kirjon oireita, jotka kannustavat jatkamaan lopetettua päihteenkäyttöä. Yleistä pahaa oloa, ahdistuneisuutta tai suoranaista päihteenhimoa korjataan aloittamalla hetkeksi lopetettu käyttö uudelleen.

## 2.5

### Alkoholiriippuvuuden lääkinälliset apukeinot

Päihteenkäytön lopettaminen aiheuttaa pahoja vieroitusoireita, jotka vaikeuttavat huomattavasti niistä eroonpääsyä. Toisaalta lopullisesti päihteistä eroon pääseminen vaatii myös pitkäaikaisen psyykkisen riippuvuuden voittamista. Juuri tämän vuoksi on tärkeää oppia tuntemaan mekanismit, jotka ovat näiden oloilojen takana. Siten voitaisiin kehittää apuvälineitä, kuten lääkitystä, näiden tuntemusten helpottamiseksi. Näin voidaan osaltaan helpottaa vaikeasti päihteistä riippuvaisten henkilöiden vieroittamista ja päihteistä erossa pysymistä.

Useita lupaavia lääkeaineita psyykkisen riippuvuuden hoitoon on löydetty ja osa on jo ehtinyt kliiniseen käyttöönkin. Näiden aineiden vaikutuskohteina ovat useat eri välittäjäainejärjestelmät ja niiden teho perustuu erilaisten oireiden hoitamiseen. Toisten (esim. glutaminergiseen järjestelmään vaikuttava akamprosaatti) vaikutus kohdistuu välittömästi päihteenkäytön lopettamisen jälkeen tuleviin oireisiin, toisten vaikkapa päihteenhimoa ja päihdehakuista käyttäytymistä vahvistavien vaikutusten heikentämiseen (esim. opiaattiantagonisti Naltreksoni) (Alho 1998). Lisäksi voidaan lääkittää myös henkistä pahaa oloa ja ahdistuneisuutta, joilla on oma osansa päihteen käytön lopettamisessa. (Petrakis ja Krystal 1997). Lopullinen vieroitus tulee tietenkin aina vaatimaan myös yhteistyöhalua itse päihteenkäyttäjältä, mutta jos

prosessiin on olemassa apukeinoja on helpompi lähteä yrittämään päihteistä eroonpääsyä.

## 2.6

### Päihderiippuvuuden geneettinen tausta

Geneettisillä tekijöillä on myös vaikutusta pitkäaikaisen päihderiippuvuuden syntyyn (Koob et al. 1998, Nurmi 1998, Lovinger 1997). Eri välittäjäaineiden reseptoreiden ja monien muiden niiden toimintaan vaikuttavien proteiinien määrissä on havaittu muutoksia kroonisten vaikutusten yhteydessä pitkäaikaisessa päihteidenkäytössä. Osa näistä muutoksista on varmasti pitkäaikaisen päihdealtistuksen aikaansaamia muutoksia, mutta on ehdotettu, että osa näistä saattaisikin olla perittyjä, päihteidenkäytön jatkamiseen kannustavia ominaisuuksia. Esimerkiksi alhaista serotoniinipitoisuutta aivoissa yritettäisiin korjata käyttämällä etanolia (Lovinger 1997, Petrakis ja Krystal 1997). Etanoli nostaa aivojen serotoniinipitoisuutta monien muiden vaikutustensa ohella.

Ainakin kokaiinilla on havaittu olevan vaikutuksia myös aivojen proteiini-synteesiin. Eräiden transkriptiofaktoreiden ja niiden säätelemien aikaisten geenien ekspressiossa tapahtuu selviä muutoksia. Nämä muutokset voivat osaltaan olla edesauttamassa käytön muuttumisessa kertaluonteisesta jatkuvaksi (Koob et al. 1998). Jalostuksen avulla on saatu aikaan rottakantoja joiden perinnöllinen taipumus nauttia etanolia eroaa toisistaan. Tällaisen eläinmallin avulla on mahdollista tutkia mistä perinnölliset erot vaikkapa etanolinkäytössä johtuvat. Tähän mennessä ei ole vielä lopullista varmuutta siitä mikä tämän toisistaan poikkeavan käytöksen taustalla on, mutta ilmeisesti siinä ei ole kyse pelkästään dopamiinin välittämästä vaikutuksesta (Nurmi et al. 1996, Kiianmaa et al. 1995).

Geneettisten erojen lisäksi eläimissä on myös yksilöllistä vaihtelua, jonka vuoksi luotettavien tulosten aikaansaaminen edellyttää riittävää toistoa ja näiden tekijöiden huomioon ottamista tuloksia käsiteltäessä. Eräät tutkijat ovat havainneet myös mm. ikääntymisen vaikuttavan etanolinkäytön yhteydessä vapautuvan dopamiinin ja serotoniinin määriin. Vanhemmilla eläimillä accumbens-tumakkeen dopamiinin ja serotoniinin perustasot ovat korkeammat ja niiden herkkyyys etanolille pienempi kuin nuorilla eläimillä (Yoshimoto et al. 1998).

### 3

## KÄYTÖN ALOITTAMISTA JA JATKAMISTA EDISTÄVÄT TEKIJÄT

### 3.1

#### Positiivinen ja negatiivinen vahvistaminen

Päihteidenkäytön aloittaminen vaatii yleensä nk. positiivisten vahvistavien tekijöiden olemassaoloa. Tällainen tekijä voi esimerkiksi lisätä koettua mielihyvän tunnetta, kuten käy monien päihteiden kohdalla. Tätä jonkin toiminnan seurauksena saatavaa palkkiota kutsutaan vahvistajaksi (Kiianmaa ja Hyytiä 1998). Solunulkoisen dopamiinin määrän kasvu accumbens-tumakkeessa liittyy osaltaan mielihyvän tunteen syntymiseen tai sitä voidaan ainakin käyttää viitteenä eläimen tai ihmisen olotilan muutosten suunnasta. Käytön muuttumisessa pidempiaikaiseksi tärkeitä ovat myös negatiiviset vahvistavat tekijät. Nämä tekijät ajavat käyttäjää jatkamaan päihteidenkäyttöä, jotta aivojen muuttuneen toiminnan seurauksena syntyneitä epämiellyttäviä tuntemuksia ei koettaisi. Negatiiviseen vahvistamiseen johtavina tekijöinä toimivat lähinnä henkiset vieroitusoireet, mm. yleinen ahdistuneisuus, ärtyisyys ja muut epämiellyttävät tuntemukset (Koob et al. 1998, Self 1998, Roberts ja Koob 1997). Fyysisillä vieroitusoireilla, kuten lämmönvaihteluilla, hikoilulla tai vapina-kohtauksilla on tuskin lainkaan merkitystä tässä tapahtumassa (Koob 1998, Wise 1996).

Päihteiden tuottamat hyvänolon tuntemukset ja niiden kyky poistaa käytön lopettamisesta johtuvia negatiivisia vaikutuksia, ovat yhdessä voimakkaasti käytön uudelleen aloittamista kannustava voima. Negatiivisen vahvistamisen taustalla on mahdollisesti aivojen mielihyvää tuottavan järjestelmän turtuminen tai tottuminen jatkuviin tätä keino-tekoisesti vahvistaviin aineisiin. Kun päihteidenkäyttö lopetetaan, ei vieraista aineista johtuvaa aktivaatiota mielihyväkeskuksissa enää tunnetakaan. Tämä taas johtaa pienentyneisiin välittäjäainepitoisuuksiin mainituilla alueilla ja sitä myöten mielialan laskemiseen. Päihteiden käytön lopettamisen jälkeen ainakin kokaiinilla, amfetamiinilla, opiaateilla, etanolilla ja nikotiinilla on havaittu olevan tämänsuuntaista vaikutusta (Rossetti 1992).

### 3.2

#### Vahvistavien tekijöiden tutkimiseen käytetyt menetelmät

Erilaisten vahvistavien tekijöiden tutkimiseen on käytetty lähinnä kolmenlaisia menetelmiä (ks. esim. katsausartikkelit Wise 1996 ja 1998 sekä Wise ja Bozarth 1981). Päihteiden itseannostelussa koe-eläimen annetaan itse käyttää päihdettä niin paljon kuin se tietyn rajoituksen haluaa. Usein päihteen saatavuutta rajoitetaan esim. vain tiettyyn ajankohtaan päivässä, sillä muuten eläimillä on taipumus annostella itsensä hengiltä, eikä pitkäaikaisten seurausten tutkiminen ole mahdollista. Toisinaan eläimeltä voidaan odottaa myös tiettyä tehtävää ennen kuin se saa haluamansa päihdeannoksen. Tehtävänä voi toimia vaikkapa oikean painikkeen painaminen päihteen annostelemiseksi. Itseannostelun muutoksista pitkäaikaisen käytön seurauksena tai kokeessa käytettävistä aineista johtuvista muutoksista eläinten päihteiden



denkäytössä, voidaan päätellä paljon tapahtumista, jotka näihin muutoksiin ovat johtaneet. (Roberts ja Koob 1997).

Toinen yleisesti käytetty menetelmä on aivojensisäinen itsestimulaatio (intracranial self-stimulation eli ICSS). Tässä tarkasti määrättyyn aivoalueeseen sijoitettu elektrodi välittää suoraan aivoihin sähköimpulsseja, jotka kykenevät aktivoimaan hermosoluja (Garris et al. 1999). Eläimet saavat itse painiketta painamalla päättää haluavatko ne näitä virtapulsseja määrättyyn aivoalueeseen vai eivät. Ventraaliseen tegmentumiin sijoitettu elektrodi saa eläimet jatkuvasti annostelevaan itseensä näitä virtapulsseja ja sitä myöten aktivoimaan tämän alueen hermosoluja (Wise ja Bozarth 1981, Wise 1978). Näiden alueiden solujen, tai näillä alueilla olevien aksonien ja dendriittien päissä olevien solujen, aktivoituminen on siis tätä käyttäytymistä vahvistavaa (Roberts ja Koob 1997). Tutkimuksissa on myös havaittu, että kun jotakin päihdettä on käytetty, riittää pienempi virta aikaansaamaan normaalin vasteen (Di Chiara 1995).

Kolmannessa koejärjestelyssä tutkitaan eläinten paikkapreferenssiä. Tietystä ympäristöstä eläimille annetaan päihdettä ja toisenlaisessa ympäristössä taas ei. Riittävän toiston jälkeen eläimen annetaan päättää kummassa ympäristössä se mieluummin aikaansa viettää. Jos annetulla päihtellä on vahvistavia vaikutuksia sen käytön jatkamiseen, pitäisi eläimen oleskella pidempään alueella, jonka maisemat se yhdistää kokemaansa hyvinolontunteeseen. Samoilla menetelmillä voidaan tutkia myös negatiivisia vahvistavia tekijöitä. Tekemällä kokeet, kun eläimille ei yllättäen annetakaan päihhteitä tai kun ne kärsivät vieroitusoireista, saadaan näihin tapahtumiin vaikuttavat asiat selville. (Di Chiara 1995).

## 4

### DOPAMIINI JA SEN MERKITYS PÄIHTEIDENKÄYTÖSSÄ

#### 4.1

##### Dopamiinin vaikutus

Dopamiini vaikuttaa soluissa neuromodulaattorina G-proteiinin välityksellä glutamaattiherkkien kanavien toimintaan. Se säätelee kohteenaan olevien hermosolujen ärtyvyyttä muuttamalla niiden kalvojännitettä ja aktipotentiaaleissa tärkeiden ionien konduktanssia. Vaikutus kohdistuu varsinkin  $K^+$ -kanavien toiminnan muokkaamiseen. Dopamiinin rooli on erittäin keskeinen siitä huolimatta, että se ei itse suoranaisesti toimikaan soluissa aktiopotentiaaleja laukaisevana välittäjäaineena. (Di Chiara 1995).

Dopamiinin tehtävä accumbens-tumakkeen dopamiinia sisältävien solujen aktivoituessa on rohkaista eläintä suorittamaan tai toistamaan jotakin toimintoa, joka aktivoikin nämä solut. Tämä toiminto voi olla ruuan syöminen tai vaikkapa etanolin juominen (Di Chiara 1997). On myös esitetty, että dopamiinin tehtävä olisi toimia "ilmaisimena" siitä onko tietyllä toiminnalla eläimelle mielekkäitä vaikutuksia. Mitä korkeampi dopamiinipitoisuus, sitä todennäköisemmin eläin säilyttää kiinnostuksensa siihen mitä se oli parhaillaan tekemässä. (Garris et al. 1999, Nurmi 1998, Joseph 1996). Dopamiini liittyy päihteenkäyttöä säätelevän ominaisuutensa ohella myös eräiden sairauksien syntymiseen. Dopaminergisen viestinvälityksen häiriöt ovat syynä moniin Parkinsonin taudin oireisiin ja onpa sen esitetty olevan osallisena myös joissakin skitsofrenian muodoissa (Cooper et al. 1996).

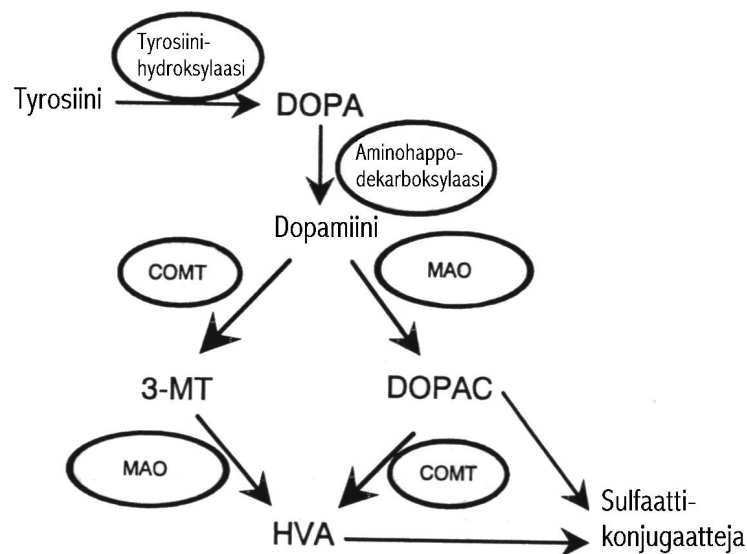
#### 4.2

##### Dopamiinin metabolia

##### 4.2.1

##### Dopamiinin anabolia

Dopamiini syntetoidaan soluissa käyttäen lähtöaineena tyrosiinia. Sytoplasmassa toimiva tyrosiinihydroksylaasi muuttaa sen ensin dihydroksifenyylialaniiniksi (L-DOPA). Syntynyt L-DOPA muutetaan dopamiiniksi dekarboksyloimalla, entsyyminä toimii aromaattisten aminohappojen dekarboksylaasi (Kuva 2). Ensimmäinen reaktio on dopamiinin synteessin kannalta rajoittava tapahtuma. Suurin osa solun dopamiinisynteesiin liittyvästä säätelystä kohdistuu siksi juuri tähän entsyymiin ja sen toimintaan (Cooper et al. 1996). Valmistettu dopamiini varastoidaan varastorakkuloihin, joista se aktiopotentiaalin saapuessa vapautetaan synapsirakoon kalsiumvälitteisellä eksosytoosilla.



Kuva 2. Dopamiinin, DOPAC:in, HVA:n ja 3-MT:n metabolia. (Honkanen 1999)

#### 4.2.2

##### Dopamiinin vapautuminen ja katabolia

Dopaminergisen aktiivisuuden tärkein keskeyttäjä on dopamiinin takaisinotto synapsiraosta vapautumisen jälkeen. Solukalvolla olevat korkea-affiniteettiset kuljettajat pumppaavat aktiivisesti valtaosan dopamiinista takaisin, joko sitä vapauttaneeseen soluun tai ympäröiviin soluihin käyttäen solussa vallitsevaa  $\text{Na}^+$ -gradienttia energialähteenään. Solun sisällä dopamiini hajotetaan mitokondrion ulkokalvolla sijaitsevan monoamiinioksidaasin (MAO) avulla dihydroksifenyylietikkahapoksi (DOPAC), josta osa kulkeutuu solusta ulos. Varsin suuri osa vastasyntetoidusta dopamiinistakin hajotetaan MAO:n toimesta ennen kuin se on kerinnyt vapautumaankaan. Tällä saattaa olla merkitystä joissain dopamiinin synteesiä kiihdyttävissä tapahtumissa. Solusta poistuneen DOPAC:in kohtalona on vapaana solun ulkopuolella tai plasmamembraaniin sitoutuneena oleva katekoli-O-metyyli transferaasi (COMT), joka muuttaa sen edelleen homovanilliinihapoksi (HVA). Osa dopamiinista muutetaan liukoisen tai solukalvosidonnaisen COMT:in avulla suoraan 3-metyyli-tyramiiniksi (3-MT) ja edelleen MAO:n avulla HVA:ksi. 3-MT:n pitoisuuden voimakas kasvu kertoo solun voivan huonosti ja olevan kuolemassa. Solunulkokaisen DOPAC:in ja HVA:n pitoisuudet eroavat eri nisäkäsryhmien välillä, esimerkiksi rotilla DOPAC on tärkein metaboliitti, kun taas kädellisillä se on HVA. (Honkanen 1999, Cooper et al. 1996)

#### 4.3

##### Dopamiinireseptorit

#### 4.3.1

##### $D_1$ - ja $D_2$ -perheen reseptorit

Dopamiinin vaikutuksen monimuotoisuus selittyy osaksi usean eri reseptorin olemassaololla. Reseptorit voidaan jakaa kahteen perheeseen  $D_1$ -reseptorin kaltaisiin ( $D_1$  ja  $D_5$ ) ja  $D_2$ -reseptorin kaltaisiin ( $D_2$ ,  $D_3$  ja  $D_4$ ) (De

Keyser, 1993). D<sub>1</sub>-reseptorit säätävät membraanipotentiaalin sellaiselle tasolle, että aktiopotentiali ryöppyjen laukaiseminen solun aktivoituessa on kaikkein otollisinta, mikä taas mahdollistaa NMDA-kanavien toiminnan kautta pitkäaikaisten vaikutusten syntymisen. D<sub>1</sub>-reseptorin toiminta on liitetty mm. lisääntyneeseen päihteiden käyttöön itseannostelun aikana (Self 1998). D<sub>2</sub>-reseptorit taas toimivat päinvastoin ja estävät ryöppyjen laukaisemisen. Tämä D<sub>2</sub>-reseptorin välittämä vaikutus syntyy lähinnä glutamaattiherkkien AMPA-kanavien toiminnan muokkaamisella. Näiden kanavien toiminta on osaltaan mukana vieroitusoireiden aikaisen päihteidenhimon kasvamisessa (Self 1998). Pelkästään reseptorityyppi ei kuitenkaan ole ainoa muuntelua vasteissa aiheuttava tekijä, vaan myös solun kulloinenkin kalvojännite määrää kuinka DA:n sitoutuminen soluun vaikuttaa. Reseptorien keskittyminen accumbens-tumakkeen eri osiin tuottaa myös erilaisia vasteita riippuen siitä missä dopamiinia vapautuu.

#### 4.3.2

##### Auto- ja heteroreseptorit

Dopaminergisten solujen pinnalla, soomassa ja hermopäätteissä, on myös D<sub>2</sub>-perheeseen kuuluvia autoreseptoreita. Niiden aktivoituminen vähentää näiden solujen vapauttaman dopamiinin määrää. Autoreseptorit toimivat myös monien dopamiinin agonistien sekä antagonistien sitoutumiskohtana (Cooper et al. 1996). Ympäristön soluissa on myös heteroreseptoreja, jotka puolestaan vaikuttavat kunkin solun erittämien välittäjäaineiden määriin. Mainittujen reseptorien avulla solut voivat muuttaa toimintaansa kulloiseenkin tilanteeseen sopivaksi. D<sub>2</sub>-perheen reseptorien aktivoituessa solun välittäjäaineiden vapauttaminen vähenee, ja solu kykenee pienentämään taustakohinaa. D<sub>1</sub>-perheen reseptorin aktivoituminen taas lisää välittäjäaineiden erittymistä. Tämä mahdollistaa voimakkaamman signaalinvälityksen laajalle alueelle (Di Chiara 1997 ja 1995).

#### 4.4

##### Dopamiinin erityis

Useat eri tutkimukset ovat yrittäneet selvittää milloin dopamiinin erityis aivoissa kasvaa: ärsykettä odottaessa, sen aikana vai sen jälkeen. Riippuen koeasettelusta dopamiinin konsentraation on havaittu kasvavan kaikissa mainituista vaiheista. Sekä positiivisten että negatiivisten vahvistavien tekijöiden vaikutuksesta voidaan havaita dopamiinin konsentraation kasvavan, mistä syystä sen on esitetty ilmaisevan lähinnä ärsykkeen merkitsevyyttä eläimelle sen vallitsevassa motivaatiotilassa (Di Chiara 1995). Tässäkin yhteydessä on hyvä muistaa, että mielihyvän tunnetta synnyttävien neuronien välisten välittäjäaineiden suuren määrän vuoksi ei riitä ainoastaan yhden aineen pitoisuuden muutosten mittaaminen. Tiedetään, että ainakin serotoniinilla, GABA:lla, glutamaatilla, endogeenisillä opiaateilla ja noradrenaliinilla on oma osansa näissä prosesseissa (Yan et al. 1998, Roberts ja Koob 1997).

#### 4.5

##### Dopamiinin merkitys päihteiden väärinkäytössä

Hyvinkin erilaisiin aineryhmiin kuuluvien päihteiden käyttö kasvattaa ekstrasellulaarisen dopamiinin määrää varsinkin accumbens-tumakkeessa. Ainakin psykostimulanttien, kuten kokaiinin ja amfetamiinin, narkoottisten analgeettien, etanolin ja nikotiinin kohdalla näin on osoitettu tapahtuvan (Di Chiara 1995). Kunkin aineen vaikutusmekanismit ovat sen sijaan toisistaan poikkeavia.

#### 4.5.1

##### Eri päihteiden vaikutuskohteet

Dopaminergisessä järjestelmässä päihteen vaikutus voi periaatteessa kohdistua seitsemään eri kohderyhmään: dopamiinin synteesiin, varastointiin, vapautumiseen, interaktioihin reseptorin kanssa sekä sen takaisinottoon tai MAO:n ja COMT:in toiminnan muokkaamiseen (Cooper et al. 1996). Kokaiini ja amfetamiini estävät dopamiinin takaisinottoa soluihin sekä lisäävät sen synteesiä, narkoottiset analgeetit, etanoli ja nikotiini stimuloivat solujen laukaisuaktiivisuutta. Etanolin tapauksessa tämä vaikutus syntyy epäsuorasti inhiboivan mekanismin kautta. Ainakin GABA- ja opioidijärjestelmien on osoitettu olevan tärkeitä etanolin aikaansaamassa accumbens-tumakkeen dopamiinin määrän kasvussa (Gonzales ja Weiss 1998, Di Chiara 1997). Tämä vaikutus välittyy lähinnä VTA:n kautta, sillä paikallisesti accumbens-tumakkeeseen annosteltu etanoli ei saa aikaan niin merkittävää dopamiinin määrän kasvua kuin systeemisesti annettu (Samson et al. 1997). Dopamiinin määrän kasvu seuraa hyvin tarkasti etanolin konsentraation kasvua aivoissa (Hyeon et al. 1998). Eri päihteiden vaikutus ei kuitenkaan varmasti ole näin suoraviivaista, eikä tulosten tulkitseminen aina ole kovin yksioikoista.

#### 4.5.2

##### Päihteidenkäytöstä johtuvat käyttäytymismuutokset

Dopamiinin pitoisuuden kasvaessa accumbens-tumakkeessa voidaan havaita joitakin käyttäytymisen tasolla näkyviä muutoksia. Liikeaktiivisuus kasvaa, jopa päihteillä joiden perusvaikutus on lamaava. Tietyillä pitoisuuksilla liikeaktiivisuuden kasvu ylittää päihteen lamaannuttavan vaikutuksen ja käyttäytymisen perusteella voidaan havaita aivoissa tapahtuvia muutoksia välittäjäainepitoisuuksissa (Di Chiara 1995, Wise 1996). Kaikkia muutoksia käyttäytymisessä päihteidenkäytön yhteydessä ei kuitenkaan voida selittää pelkästään dopamiinin avulla. Etanolilla ja varmasti monilla muillakin päihteillä on myös niiden pitoisuudesta riippuvaisia vaikutuskohteita aivoissa. Tietty kohteet ovat herkempiä ko. aineelle kuin toiset, joiden toiminta häiriintyy vasta kun aineen pitoisuus ylittää niille kriittisen rajan. Tietty GABA<sub>A</sub>-kanavatyyppit näyttäisivät olevan herkempiä etanolin vaikutuksille kuin NMDA-kanavat ja tämä johtaisi dopamiinin määrän kasvuun accumbens-tumakkeessa GABAergisen inhibition pienentyessä. Myöhemmin etanolin käytön jatkuessa ja pitoisuuden noustessa myös muut välittäjäainejärjestelmät tulisivat entistä tärkeämmiksi. (Samson et al. 1997).

#### 4.6

##### Annostelutavan ja -paikan vaikutus dopamiinin eritykseen

Dopamiinin määrän kasvu accumbens-tumakkeessa saattaa vaihdella päihteen annostelutavan mukaan. Ainakin kokaiinin tapauksessa intraperitoneaalisesti annettu injektio ei aiheuta niin suurta vastetta käyttäytymisen tasolla, kuin i.v. -injektiona annettu; paikkapreferenssi ei ole niin voimakas kuin suonensisäisesti annettussa päihteesä (Hyeon et al. 1998). Myöskin toleranssin syntyminen tietyn päihteen aiheuttamalle vaikutukselle saattaa vaihdella sen mukaan, kuinka kyseistä päihdettä on

annosteltu. Etanolin tapauksessa itseannostelu näyttäisi aiheuttavan toleranssin, mutta muilla tavoilla nautittu etanoli kenties ei (Nurmi et al. 1996). Jatkuvan itseannostelun avulla etanoliin totutetut rotat eivät myöskään koe yhtä suurta dopamiinin määrän nousua kuin muuta kautta etanolia saaneet eläimet (Nurmi et al. 1996). Aktiivisella käyttäytymisellä etanolin hankkimiseksi näyttäisi siis olevan jotakin vaikutusta päihteen palkitsevuuteen.

Kaikkien päihteiden kohdalta ei ole käytettävissä tietoa siitä onko annostelutavalla vaikutusta vai ei. Vaikka lähes kaikkien päihteiden palkitsevien ominaisuuksien oletetaan olevan lähtöisin mesolimbisen dopaminergisen radan aktivaatiosta, eivät eri aivoalueihin kohdistetut leesiöt tai viestinvälityksen blokkaukset tue varauksetta ennustettuja toimintamekanismeja. Antamalla koe-eläinten itseannostella joko tiettyä päihdettä tai sopivaa välittäjäainemekanismin antagonistia, pystytään kuitenkin pala palalta löytämään kullekin päihteelle tärkeimmät vaikutusalueet. Näiden alueiden rajaaminen vain on erittäin vaikeaa, varsinkin kun vaikutus ei aina kohdistu vain pienelle tarkkaan rajatulle alueelle. Tärkein vaikutuskohde voi olla lähes kokonaan tuhottu, mutta muiden alueiden muuttunut toiminta peittää tämän vaikutuksen alleen, eikä käyttäytymisessä huomata mitään merkittävää muutosta (Nurmi 1998).

#### 4.7

##### Dopamiinin määrän tutkimiseen käytetyt menetelmät

Aivoissa olevien aineiden konsentraation määrittämiseen on käytetty useita eri menetelmiä. Aiemmin tutkimuksia jouduttiin tekemään lopettamalla eläin ja mittaamalla aivokudospaleista tutkittavien aineiden pitoisuudet. Ainakin aivojen etanolipitoisuutta on yritetty arvioida myös verinäytteiden avulla, mutta siitä kuinka hyvin nämä vastaavat aivojen sisältämiä pitoisuuksia, ei voida kaikissa tapauksissa olla kovinkaan varmoja (Nurmi et al. 1998 ja 1994). Uusien menetelmien myötä myös jatkuvat, tarkat mittaukset elävistä eläimistä ovat tulleet mahdollisiksi.

##### 4.7.1

###### Voltammetria

Käytettyjä menetelmiä ovat mm. mikrodialyysi, voltammetria ja suora sähköinen kenttäpotentiaalien mittaaminen dopaminergisten solujen läheisyydestä. Kullakin menetelmällä on oma käyttöalueensa, jossa ne ovat osoittautuneet muita paremmiksi. Voltammetrian etuna mikrodialyysiin verrattuna on sen huomattavasti nopeampi mittausaika. Herkkyys on kuitenkin huomattavasti heikompi, eikä katekolamiinien perustason mittaaminen olekaan mahdollista tällä menetelmällä (Samson et al. 1997). Tarkempia variaatioita menetelmästä kehitetään koko ajan.

##### 4.7.2

###### Mikrodialyysi

Mikrodialyysi taas soveltuu erinomaisesti mittauksiin, joissa tutkitaan päihdealtistuksen tai jonkin muun tutkittavan aineen aikaansaamia muutoksia dopamiinin tai jonkin muun välittäjäainemekanismin erityykseen. Mikrodialyysin idea perustuu pienen dialyysikalvon käyttöön, joka voidaan sijoittaa suoraan esimerkiksi aivokudokseen. Koettimen läpi virtaa jatkuvasti perfuusioneeste, joka muistuttaa koostumukseltaan mahdollisimman paljon selkäydinnestettä. Dialyysikalvon läpi siirtyä perfuusioneesteeseen kutakin ainetta sen konsentraatiosta riippuvainen määrä. Perfuusioneesteestä on

vaikkapa kromatografian avulla mahdollista määrittää sen sisältämien aineiden pitoisuudet. Mikrodialyysi on erittäin tarkka ja herkkä menetelmä, huonona puolena on ajallisen tarkkuuden heikkous. Tämä on seurausta analyysimenetelmien vaatimien nestemäärien tilavuudesta, joiden kerääminen vaatii useamman minuutin yhtämittaisen keräämisen. (Robinson et al. 1991, Ungerstedt 1991, Benveniste 1989). Mikrodialyysin avulla saadaan suoraan proteiinivapaita näytteitä, joissa ei tapahdu myöskään esimerkiksi entsyymaattista hajotusta, koska entsyymejä ei dialyysikalvon läpi pääse (Hansen et al. 1999, Tossman 1990). Dialyysikalvo päästää lävitseen vain tiettyä kokoa pienemmät molekyylit. Samasta eläimestä on mahdollista mitata myös aineen konsentraation muuttumista ajan kuluessa. Näin voidaan esimerkiksi seurata jonkin välittäjäaineen vapautumista hermopäätteistä (Laitinen 1999). Samaa eläintä voidaan usein jopa käyttää useammassa kokeessakin.

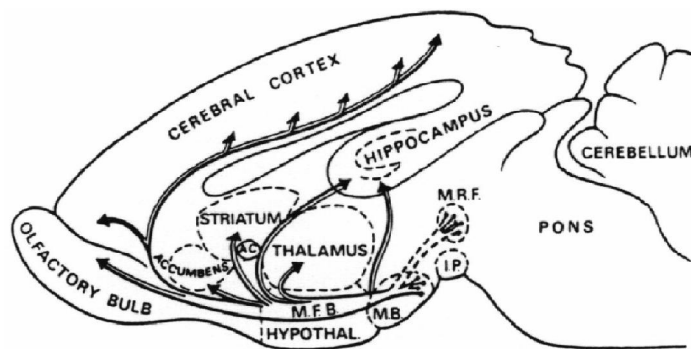
## 5

### HISTAMIINI

#### 5.1

##### Histamiinin tehtävä

Histamiini on biogeeninen amiini, jota tavataan kaikkialla elimistössä erilaisissa tehtävissä. Koska se läpäisee huonosti aivo-veristeen, voidaan aivojen histaminerginen järjestelmä kuitenkin käsittää omaksi järjestelmäkseen (Zimatkin ja Anichtchik 1999). Toistaiseksi kaikkia histamiinin vaikutuskohteita ja -tapoja ei vielä kuitenkaan tunneta. Aivoissa histamiini toimii välittäjäaineena ja neuromodulaattorina säädellessään muun välittäjäaineen vapautumista. Se osallistuu mm. vireystilan, ruokahalun, juomisen, ruumiinlämmön, kivuntunnon, vuorokausirytmien, muistin ja oppimisen sekä hormonierityksen säätelyyn (Laitinen 1999, Lecklin 1999, Kraly et al. 1995). Histaminergiset hermosolut sijaitsevat lähes pelkästään hypotalamuksen takaosassa, tuberomammilaarisissa tumakkeissa (Kuva 3), joista niiden hermopäätteet levittäytyvät lähes koko aivojen alueelle (Zimatkin ja Anichtchik 1999, Chronister 1982).



Kuva 3. Histaminergisten neuronien sijainti ja niiden lähettämät efferentit. M.B. = tuberomammilaarinen tumake. (Cooper et al. 1996).

#### 5.2

##### Histamiinireseptorit

Histamiinin vaikutukset välittyvät kolmen reseptorin, histamiini  $H_1$ -,  $H_2$ - ja  $H_3$ -reseptorin kautta. Histamiini  $H_1$ -reseptorin kautta syntyvät esimerkiksi monet allergiset reaktiot ja yleisesti käytetyt antihistamiinit vaikuttavat oireita lieventävästi juuri sen välityksellä (Laitinen 1999).  $H_1$ -reseptori osallistuu lisäksi ruokahalun säätelyyn (Lecklin 1999). Sen on esitetty olevan myös osittain vastuussa päihteidenkäytössä tärkeän mesolimbisen dopamiiniradan hermosolujen aktivoinnissa (Fleckenstein et al. 1993).

$H_2$ -reseptorin salpaajat puolestaan ovat tehokkaita mahahapon erityksen vähentäjiä, joita käytetään mahahaavan ja närästyksen hoidossa.

##### 5.2.1

##### Histamiini $H_3$ -reseptori

Histamiini  $H_3$ -reseptori ja sen vaikutukset ovat parhaillaan vilkkaan tutkimuksen kohteena. Ne toimivat autoreseptoreina histaminergisissä soluissa tai heteroreseptoreina muita välittäjäaineita käyttävissä soluissa. Autoreseptorit pienentävät histaminergisten solujen laukaisuaktiivisuutta tuberomammilaarisessa tumakkeessa. Todennäköisesti tämä on



seurausta autoreseptoreiden kyvystä estää  $\text{Ca}^{2+}$ -ionien viratausta. (Hill et al. 1997, Arrang et al. 1983). Heteroreseptorit puolestaan muokkaavat monien välittäjäaineiden, kuten serotoniinin, dopamiinin, asetyylikoliinin ja noradrenaliinin vapautumista (Cooper et al. 1996, Schlicker et al. 1994). Kaikkien  $\text{H}_3$ -reseptorien toiminta välittyy G-proteiinien (joko  $\text{G}_i$  tai  $\text{G}_o$ ) toiminnan muokkaamisen kautta (Zimatin ja Anichtchik 1999, Hill et al. 1997, Schlicker et al. 1994).

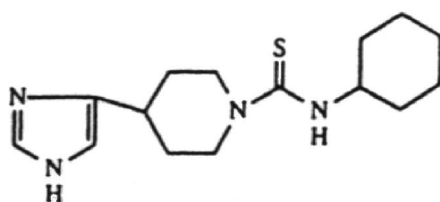
Käyttäytymisen tasolla  $\text{H}_3$ -reseptorin vaikutukset kohdistuvat ainakin juomisen ja ruokahalun säätelyyn (Kraly et al. 1995, Clapham ja Kilpatrick 1993). Erilaisten agonistien (esim.  $\text{R-}\alpha$ -metyylihistamiini) ja antagonistien (esim. tioperamidi ja clobenprobit) avulla on pyritty selvittämään  $\text{H}_3$ -reseptorin kautta syntyvien vaikutusten mekanismeja.  $\text{H}_3$ -autoreseptorin agonistien on todettu vähentävän histamiinin vapautumista, antagonistien taas lisäävän sitä (Cooper et al. 1996).

$\text{H}_3$ -reseptorilla on vaikutusta myös monien päihteiden väärinkäytön syntymisessä ja jatkumisessa. Histamiini  $\text{H}_3$ -reseptorin agonistit ja antagonistit lisäävät tai vähentävät ainakin etanolin ja kokaiinin käyttöä koe-eläimillä (Ito et al. 1997).

## 5.2.2

### Tioperamidi

Tioperamidi soveltuu erinomaisesti käytettäväksi histamiini  $\text{H}_3$ -reseptorin tutkimiseen. Tioperamidin spesifisyys  $\text{H}_3$ -reseptorille on erittäin hyvä ja se läpäisee aivo-veri -esteen. Sen dissosiaatiovakio  $\text{H}_3$ -reseptorille on noin 2500 kertaa suurempi kuin  $\text{H}_2$ -reseptorilla ja vielä satakertainen tähän verrattuna  $\text{H}_1$ -reseptorilla. Tioperamidi toimii soluissa kompetatiivisena inhibiittorina. (Hill et al. 1997, Cooper et al. 1996).

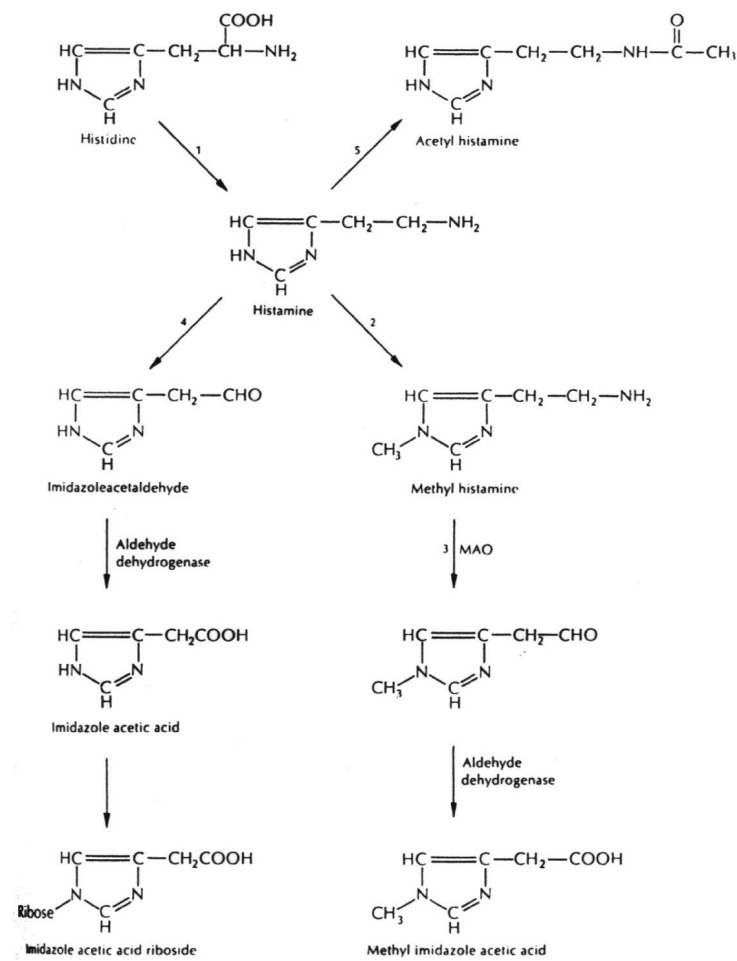


Kuva 4. Tioperamidin rakenteellinen kaava.

## 5.3

### Histamiinin ja etanolin metabolian yhteneväisyydet

Vaikka histamiinin etanolin vaikutuksia säätelevä vaikutus voikin välittyä monien muiden välittäjäaineidenkin kautta, on niillä olemassa yhteinen nimittäjä myös molempien metabolian tasolla. Molempien metaboliareittiin kuuluu aldehydidehydrogenaasin ja aldehydioksideaasin toiminta. Niinpä etanolin metaboloituessa syntyvän hyvin reaktiivisen asetaldehydin muodostuminen voi vaikuttaa histamiinin metaboliaan. Kussakin tapauksessa todellinen vaikutusmekanismi tosin on riippuvainen pitkälti etanolipitoisuudesta ja tutkittavasta eläinlajista. (Zimatin ja Anichtchik 1999).



**Kuva 5.** Histamiinin metabolia. 1 = Histidiinidekarboksylaasi, 2 = Histamiini-metyylitransferaasi, 3 = Monoamiinioksidaasi, 4 = Diaminioksidaasi (Histaminaasi), 5 = Histamiinin metabolian vaihtoehtoinen reitti. (Cooper et al. 1996).

## 6

## SEROTONIINI

## 6.1

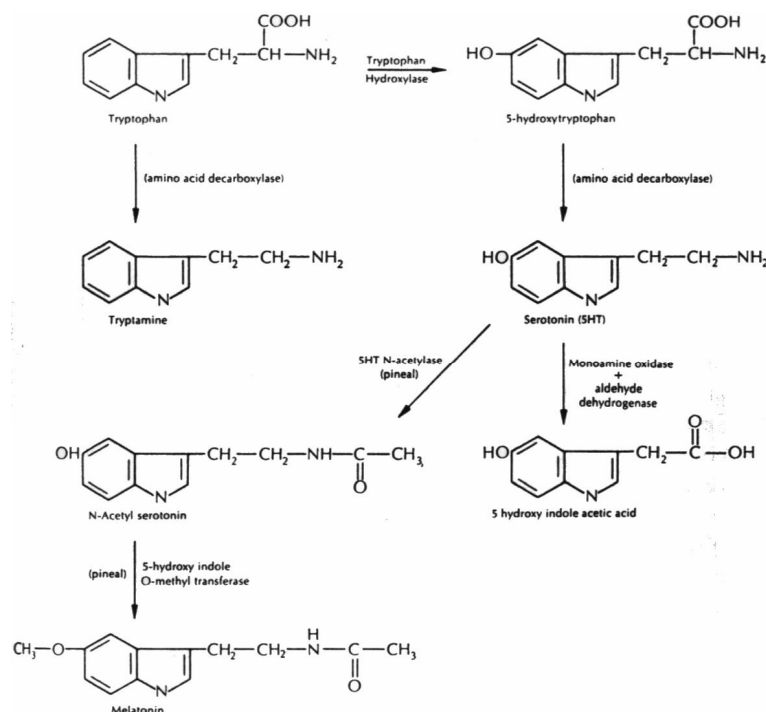
## Serotoniinijärjestelmä

Serotoniini eli 5-hydroksitryptamiini (5-HT) säätelee monia elimistön toimintoja, kuten ruokahalua, seksuaalista käyttäytymistä ja mielialoja. Serotoniinia välittäjäaineena käyttäviä soluja löytyy lähes kaikkialta aivoista ja muista kudoksista. Itseasiassa vain muutama prosentti kehon 5-HT:sta toimii aivoissa. Serotonergisten hermosolujen levinnäisyys ja niiden kyky synnyttää toistuvaa aktiivisuutta ilman eksitaatiota vittaavat niiden osallistuvan laajamittaiseen homeostaattisen tasapainon säätelyyn. (Cooper et al. 1996)

## 6.2

## Serotoniinin metabolia

Serotoniini syntetoidaan käyttäen lähtöaineena aminohappo tryptofaania (Kuva 6). Se ei läpäise veri-aivoestettä, joten kaikki aivoissa tarvittava 5-HT on syntetoitava siellä. Hermoimpulssissa vapautuneen serotoniinin takaisinotto soluun on tärkein aktiivisuuden keskeyttäjä. Monoamiini-oksidaasi muodostaa yhdessä aldehydidehydrogenaasin kanssa soluun otetusta serotoniinista 5-hydroksi-indolietikkahappoa (5-HIAA) (Kuva 6). 5-HIAA:n pitoisuudesta ei kuitenkaan kannata vetää kovin pitkälle vietyjä johtopäätöksiä, sillä se kuvastaa enemmänkin solunsisäisiä metaboliatapahtumia kuin hermovälityksen muutoksia (Kalén et al. 1988).



Kuva 6. Serotoniinin metabolia. (Cooper et al. 1996).

## 6.3

## Serotoniinireseptorit

Serotoniinilta tunnetaan useita reseptoreita, joiden vaikutusmekanismit ja sijannit poikkeavat jonkin verran toisistaan. Tähän mennessä on tunnistettu ainakin 5-HT<sub>1A/1B/1D</sub>, 5-HT<sub>2A/2B/2D</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> ja 5-HT<sub>7</sub> –

reseptorit, joista osa toimii muillekin välittäjäainesysteemeille tyypillisinä serotoniinin erityistä säätelevinä autoreseptoreina. Kaikkien reseptori-alatyypin välitysmekanismi on G-proteiinivälitteinen, lopullinen vaikutus kohdistuu useimmissa tapauksissa johonkin ionikanavaan tai adenyylaasi-syklaasiin.

#### 6.4

##### Serotoniinin merkitys päihteidenkäytössä

Muutokset 5-HT:n määrissä tai sille spesifisten reseptorien rakenteessa tai toiminnassa muuttavat herkkää välittäjäaineiden välistä tasapainoa. Nämä muutokset saattavat olla yhtenä tekijänä monien päihteiden aikaansaamissa muutoksissa ja niiden pitkäaikaiseen käyttöön johtavissa tapahtumissa. Ainakin etanolin ja kokaiinin on havaittu muuttavan aivojen serotoniinijärjestelmän toimintaa. Jo kerta-altistus etanolille voi muuttaa sen toimintaa hyvinkin pitkäaikaisesti. Kokaiini voimistaa 5-HT:n vaikutusta vähentämällä sen takaisinottoa synapsiraosta erittymisen jälkeen. (Lovinger 1997, Roberts ja Koob 1997). Jo aiemmin mainitun synnynnäisesti alhaisen serotoniinipitoisuuden korjaamiseksi aloitetun etanolinkäytön taustaksi on ehdotettu useampiakin serotoniinijärjestelmän kautta välittyviä päihteidenkäyttöä edistäviä asioita. Tällaisia ovat mm. alhaisesta serotoniinipitoisuudesta johtuvat käyttäytymisen muutokset, kuten kyvyttömyys hallita etanolinkulutusta ja muiden välittäjäaineiden, esimerkiksi dopamiinin kautta syntyvät vaikutukset (Petrakis ja Krystal 1997).

**7****MUIDEN VÄLITTÄJÄAINEIDEN MERKITYS PÄIHITEIDENKÄYTÖSSÄ****7.1****Opioidijärjestelmä**

Endogeeniset opioidit ovat elimistön tuottamia hormoneja ja neuromodulaattoreita, joiden tehtävänä on mm. muokata muiden klassisten hermovälittäjäaineiden aikaansaamia vasteita. Muuttamalla kohteenaan olevien solujen sähköisiä ominaisuuksia ne tekevät nämä solut vaikeammin aktivoituviksi, muuttaen siten kyseisten solujen erittämien välittäjäaineiden vapautumista. Vaikutus voi lopullisesti olla joko inhiboiva tai eksitoiva, riippuen siitä onko kohteena oleva hermosolu inhibitorinen vai eksitatorinen. Opioidien on huomattu inhiboivan ainakin asetyylikoliinin, dopamiinin ja noradrenaliinin eritystä ja lisäävän tai vähentävän serotoniinin ja GABAn eritystä (Froehlich 1997).

Kehon omat opioidit voidaan jakaa kolmeen ryhmään: enkefaliineihin, endorfiineihin ja dynorfiineihin. Kemiallisesti valmistettuja alkaalisia opiatteja ovat mm. huumeina käytetyt morfiini ja heroini. Kehon omien opioidien tehtävänä on inhiboida monia tapahtumia esimerkiksi kivuntuntoa. Ne vaikuttavat myös ruuansulatukseen ja verenkiertoon, aiheuttavat hyvinolontunnetta sekä muuttavat tiettyjä käyttäytymispiirteitä, kuten syömistä ja etanolinkäyttöä. (Wise 1998, Froehlich 1997).

Opioidijärjestelmällä on hyvin tärkeä merkitys monien päihteiden vaikutuksen välittäjänä. Alkaalisten opiaattien lisäksi ainakin etanolin ja nikotiinin on havaittu vaikuttavan opioidijärjestelmän toimintaan (Koob et al. 1998, Froehlich 1997). Akuutin etanolinkäytön aikana endorfiinien ja enkefaliinien geenien ilmentäminen lisääntyy, kasvattaen samalla vapautuvien endogeenisten opioidien määrää. Krooninen etanolinkäyttö sen sijaan laskee näiden geenien ekspressiota ja vähentää beta-endorfiinin vapautumista. Opioidiantagonistit, kuten naltreksoni, vähentävät tehokkaasti etanolinkulutusta ja uudestaan sen käyttöön retkahtamista vieroitusoireita kärsivissä ihmisissä (Koob et al. 1998, Petrakis ja Krystal 1997, Roberts ja Koob 1997). Tämän tapahtuman taustalla on luultavasti opioidiantagonistien kyky vähentää etanolin aikaansaamaa dopamiinin vapautumista accumbens-tumakkeessa (Gonzales ja Weiss 1998).

**7.3****GABA-järjestelmä**

GABA on aivojen tärkein inhibitorinen välittäjäaine. GABAergisten hermosolujen toiminta inhiboi monien muiden solujen toimintaa. Näitä soluja löytyy interneuroneina lähes kaikilta aivoalueilta. Niinpä ei olekaan yllättävää, että myös niiden toiminta on tärkeässä osassa päihteiden käytössä ja sen aiheuttamissa muutoksissa. Lähes kaikkien käytettyjen päihteiden on ainakin jollakin tavoin havaittu muuttavan aivojen GABAergisten solujen toimintaa (Wise 1996). Akuutin etanolinkäytön aiheuttama lamaava vaikutus välittyy GABA<sub>A</sub>-reseptorien lisääntyneen toiminnan kautta, muilla päihteillä on omat vaikutuskohteensa GABA-välitteisessä viestinnässä (Valenzuela 1997).

**7.4****Glutamaattijärjestelmä**

Glutamaatti on aivojen tärkein eksitatorinen välittäjäaine. Se vaikuttaa kohdesoluihinsa kolmen erilaisen reseptorin välityksellä, jotka on nimetty

kullekin tyypille spesifisen antagonistin mukaan, NMDA-, AMPA-, ja kainaatireseptoreiksi. Glutamaattikanavan avautuessa se päästää lävitseen lähinnä positiivisia ioneja. Tämän ionivirran ollessa riittävän suuri ja kalvopotentiaalin ylittäessä tietty ärsytyskynnys syntyy solussa aktiopotentiaali. NMDA-kanava vaatii aktivoituakseen glutamaatin lisäksi riittävän depolarisaation ja voi tämän johdosta toimia soluissa muista glutamaattiherkistä kanavista poikkeavissa tehtävissä (esim. koinsidenssi-detektorina). Glutamaattireseptoreita on kaikkialla aivoissa, mutta päihteidenkäytön kannalta keskeisiä ovat accumbens-tumakkeen, VTA:n ja isoaiivokuoren väliset glutaminergiset yhteydet ja niissä sijaitsevat reseptorit. (Gonzales ja Jaworski 1997)

Useat eri päihteet vaikuttavat glutamaattijärjestelmän toimintaan aikaansaaden muutoksia joko glutamaatin määrässä, reseptoreissa tai glutamaatin sitoutumisessa niihin. Etanoli esimerkiksi inhiboi jo hyvin pienillä konsentraatioilla NMDA-kanavien toimintaa (Gonzales ja Jaworski 1997, Petrakis ja Krystal 1997). Tämä muutos on yhtenä tekijänä vaikuttamassa moniin pitkäaikaisen etanolinkäytön oireisiin ja muutoksiin, vaikka glutamaatin vaikutus saattaa muiden välittäjäainejärjestelmien tapaan välittyä jonkin sekundäärisen järjestelmän kautta. On kuitenkin selvää, että viestinvälitykselle tärkeän glutamaatin ja sitä vaputtavien hermosolujen toiminnan muutokset eivät voi olla vaikuttamatta kokonaisuudessaan aivojen toimintaan.

## 8

## TYÖN TARKOITUS

Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu histaminergisten aineiden vaikuttavan rottien alkoholinkulutukseen (Hyytiä et al.).  $H_3$ -reseptorien agonistin, (R)- $\alpha$ -metyylihistamiinin on todettu lisäävän ja antagonistin, tioperamidin, vähentävän alkoholinkulutusta. Myöskin eläinten salininkäyttö (saliinilla tarkoitetaan 0,9 % fysiologista suolaliuosta) muuttui tioperamidin vaikutuksesta, joten taustalla on todennäköisesti jokin kokonaisvaltaisempi vaikutus eläinten juomiskäyttäytymiseen. Havainnon yksi selitysmahdollisuus olisi dopaminergisen viestinvälityksen voimistuminen accumbens-tumakkeessa. Toisessa tutkimuksessa havaittiin, että kun tioperamidia annetaan yhdessä kokaiinin tai amfetamiinin kanssa eläinten liikeaktiivisuus lisääntyy huomattavasti ja samalla näiden aineiden vaikutusaika pitenee selvästi. Toisaalta yksinään tioperamidilla ei havaittu olevan vaikutusta eläinten liikeaktiivisuuteen. Myöskin näiden havaintojen takana on mahdollisesti dopaminergisessä järjestelmässä tapahtuvat muutokset.

Nyt tehdyn työn tarkoituksena oli selvittää histamiini  $H_3$ -reseptorin antagonistin vaikutusta etanolin stimuloimaan dopamiinin vapautumiseen ja sitä seuraavaan dopamiinin metaboliittien syntymiseen accumbens-tumakkeessa. Samalla oli tarkoitus tutkia pidentääkö tioperamidi etanolin aikaansaamaa vaikutusta samoin kuin on aiemmin havaittu amfetamiinilla ja kokaiinilla tapahtuvan ja syntykö tämä vaikutus dopamiinin välityksellä.

Työn suorittaminen eläinkokeena oli välttämätöntä, sillä aivojen erittäin monimutkainen rakenne ja siihen kuuluvien hermosolujen ja niiden välisten yhteyksien monimuotoisuus ei mahdollista muiden tekniikoiden, kuten soluviljelmien, käyttöä. Työn suorittamiseen oli myönnetty eläinkoelupa ja se oli hyväksytty Kansanterveyslaitoksen eettisessä toimikunnassa.

## 9

## AINEISTO JA MENETELMÄT

## 9.1

## Käytetyt eläimet

Kokeessa käytettiin aikuisia (>3kk) Wistar-kantaan kuuluvia urosrottia. Eläinten paino oli koehetkellä  $363 \pm 6$  g ( $0 \pm$  SEM,  $n=45$ ). Ennen kokeeseen joutumistaan rotat elivät 2–4 yksilön laatikoissa (Makrolon III tai IV), josta ne leikkauksen jälkeen siirrettiin yksittäishäkkeihin. Yksittäishäkin koko oli 24x24 cm ja korkeus 30 cm. Kolme seinää oli mustaa akryyliä, etuseinä oli läpinäkyvä. Koetilannetta lukuunottamatta rotilla oli koko ajan ruokaa (SDS-RM3) ja vettä käytettävissään. Sekä varsinaisessa koehuoneessa että naivien rottien asuinhuoneessa ylläpidettiin keinotekoista valorytmiä; 12 tuntia valoisaa, 12 tuntia pimeää (valoisaa aikaa 6.00–18.00). Huoneiden lämpötila oli  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  ja suhteellinen ilmankosteus  $55 \pm 10$  %.

Mikrodialyysikokeet suoritettiin vapaasti liikkumaan pääsevillä eläimillä kunkin eläimen kotihäkissä. Jokainen rotta osallistui yhteen kokeeseen mikäli tämä oli onnistunut. Jos koe jostain syystä, esim. koetilanteesta sattuneesta häiriöstä, kuten koettimen irtoamisesta johtuen ei onnistunut, saatettiin rotalla tehdä myös toinen koe. Kaikkiaan kokeisiin käytettiin 42 rottaa.

Eläimet totutettiin koetilanteeseen kiinnittämällä ne kaulapannastaan dialyysikäsiivarten ja antamalla niiden liikkua tämän jälkeen kiinnityksen sallimissa rajoissa jonkin aikaa (30 min–3 h). Tätä toistettiin koetta edeltävinä päivinä kunnes rotat olivat tottuneet yläpuolellaan näkyvään käsiivarten ja määrääjain tapahtuvaan käsittelyyn. Useimmat eläimet tottuivat tähän 2–5 käsittelykerran aikana.

## 9.2

## Leikkaus

Rotta punnittiin ja nukutettiin sen jälkeen halotaanilla (3,5 %, 4 min 30 s). Halotaanianestesiaa ylläpidettiin koko leikkauksen ajan (tarpeen mukaan 1–2,5 %) valvoen, että rotta oli koko ajan riittävän syvässä narkoosissa. Rauhallinen hengitys, rentoutuneet lihakset, silmänräpäytysrefleksin puuttuminen ja jalan liikkumattomuus varvasta nipistettäessä toimivat riittävän narkoosin ilmaisimina. Sinertävät jalat, kylmä häntä sekä hengityksen epäsäännöllisyys ja liiallinen rauhallisuus taas varoittivat liian syvästä narkoosista, tällöin halotaanin määrää pienennettiin ja tarvittaessa se lopetettiin hetkeksi kokonaan. Lopuksi ennen leikkauksen aloittamista rotan silmiin laitettiin vielä muutama silmätippa (Oftan-MC, Leiras, metyyliiselluloosa 15 mg/ml) silmien kuivumisen estämiseksi.

Nukutettu rotta kiinnitettiin stereotaktisesti korvakäytävistään ja etuhampaistaan leikkauspöytään. Päälaelta ajeltiin karvat ja ihoon tehtiin viilto kallon paljastamiseksi. Kalloon porattiin varovasti reikä käyttäen hammaslääkärin poraa ja pientä ( $\phi$  2,3 mm) terää. Paxinoksen ja Watsonin atlaksen (Paxinos ja Watson 1982) mukaan ohjainkanyyli laskettiin accumbens-tumakkeen kuoriosaan. Tämä oli mahdollista etsimällä päälaen luiden yhtymäkohta, bregma, josta siirryttiin kartaston ohjeiden mukaan tarvittavat millimetrimäärät accumbens-tumakkeeseen (1,7 mm eteenpäin bregmasta, 1,5 mm lateraalisesti keskiviivasta ja 6,5 mm alaspäin duran pinnasta). Lateraalinen siirtyminen varmistettiin vielä



ohjainkanyyliä varten poratusta reiästä paljastuneesta aivolohkojen välissä kulkevasta verisuonesta, joka kertoi keskiviivan paikan. Ohjainkanyylin kiinnittämiseksi porattiin myöskin kolmelle ruuville reiät. Ruuvit kiinnitettiin kallon luihin vahingoittamatta aivoja. Kanyylin ja kallon luiden välinen kolo tiivistettiin luuvahan avulla ja kanyyli kiinnitettiin hammasementillä kalloon ja siihen kiinnitettyihin ruuveihin. Ihon reunat vedettiin kiinni hammasementtiin joka peitti tehdyn haavan. Mikäli ihoon olisi tehty pidempi viilto leikkauksen muiden vaiheiden helpottamiseksi, olisi haavan sulkeminen ollut mahdollista myös tikeillä. Suosin työssäni kuitenkin lyhyempää viiltoa jolloin haavan reunat peittyivät hammasementin alle eikä tikkejä tarvittu.

Leikkauksen jälkeen rotalle annettiin kipulääkityksenä buprenorfiinia (Temgesic 0,3 mg/ml) subkutaanisesti noin 0,15 mg/kg. Rotta merkittiin, sille kiinnitettiin kaulapanta jonka jälkeen se vietiin omaan kotihäkkiinsä toipumaan leikkauksesta. Kipulääkitystä jatkettiin seuraavina päivinä mikäli eläimellä oli kipuja tai käytöksessä havaittiin jotain poikkeavaa. Lähes kaikki rotat kuitenkin heräsivät nopeasti anestesiasta, alkoivat syödä ja juoda ollen jo seuraavana päivänä olosuhteisiin nähden hyväkuntoisia. Uutta lääkitystä ei siten yleensä tarvittu.

### 9.3

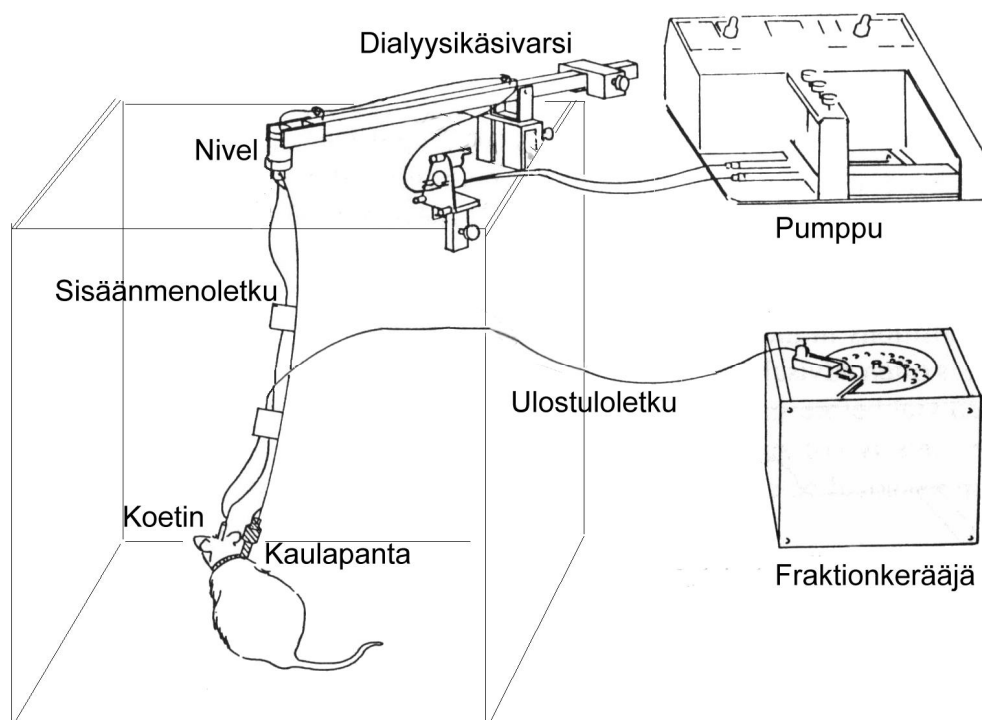
#### Mikrodialyysin suorittaminen

Kokeet aloitettiin aina aamuisin kello 7.30 punnitsemalla rotat ja vaihtamalla koettimen läpi kulkemaan ringerliuosta ( $\text{NaCl}$  147 mM,  $\text{KCl}$  3 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -puskurissa, pH 7,25) aiemmin virranneen veden sijaan (Niesell 1996). Rotta kiinnitettiin dialyysikäsiivarteen ja koetin (CMA/12, halkaisija 0,5 mm, dialyysikalvon pituus 2 mm, membraanilla joka päästää lävitseen <20 kD molekyylit) asetettiin ohjainkanyylin kautta aivoihin (Kuva 7). Käytetyn pumpun CMA 100 (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden) tai Univentor 801 (Univentor Ltd., Malta) joihin oli liitetty 1 ml Hamilton-ruisku, virtaus asetettiin 1,4  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Fraktionkerääjät käynnistettiin, jotta rotat tottuisivat niistä määrääjain kuuluviin ääniin. Hännänpäästä nipsaistiin hyvin pieni pala verinäytteiden ottoa varten.

Aivojen annettiin toipua koettimen aiheuttamasta vauriosta noin 2,5–3 tuntia ennen kokeen aloittamista. Tämä odotus oli tärkeää, jotta dopamiinin perustasosta saataisiin luotettava mittaustulos. Dopamiini on varastoituna hermosoluissa välittäjäainerakkuloihin, joista se solun vaurioituessa vapautuu solunulkoiseen tilaan. Tämä soluista vapautunut dopamiini nostaa sen solunulkoisen pitoisuuden epänormaalin korkeaksi, joka tasoittuu vasta kun vaurio ehtii korjaantumaan. Mainittu aika riittää dopamiinin pitoisuuden tasaantumiseen.

Kokeissa kerättiin 15 minuutin fraktioita putkiin joissa oli 3  $\mu\text{l}$  1 mM glutathionia 0,15 M suolahapossa. Tämän oli tarkoitus estää kerättyjä näytteitä hapettumasta ennen kuin ne saatiin ajetuksi korkean suorituskyvyn nestekromatografialla (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), jossa aineiden detektio perustuu juuri aineiden hapettumiseen tai pelkistymiseen. Näytteiden keräämisestä huolehti automaattinen fraktionkerääjä (CMA 142, Carnegie Medicin, Stockholm,

Sweden). Jotta näytteet olisivat kokeneet mahdollisimman samanlaisen käsittelyn, pidettiin aiemmin kerättyjä näytteitä jääkaapissa, josta ne kunkin kokeen valmistuttua siirrettiin yhtäaikaan pakastimeen  $-80^{\circ}\text{C}$ . Kustakin rotasta kerättiin kuusi 15 minuutin fraktiota perustasojen määrittystä varten. Näistä näytteistä saatiin määritettyä mitattavien aineiden perustaso ennen kuin sitä oli mitenkään kokeellisesti muutettu. Tämän jälkeen rotille annettiin intraperitoneaalisesti tioperamidia (10 mg/kg) tai kontrolleille vastaava määrä saliniä. Kerättiin kaksi 15 minuutin fraktiota, jonka jälkeen rotille annettiin intraperitoneaalisesti 1,5 g/kg etanolia (12% w/v) tai vastaava määrä saliniä. Puolen tunnin kuluttua etanolipistoksesta otettiin hännänpäästä kaksi verinäytettä  $25\ \mu\text{l}$  lasikapillaareilla, josta veri siirrettiin kaasukromatografiputkiin, joissa oli  $225\ \mu\text{l}$  tislattua vettä punasolujen hemolysoimiseksi. Etanoli-injektion jälkeen kerättiin vielä yhdeksän fraktiota, jonka jälkeen koe lopetettiin.



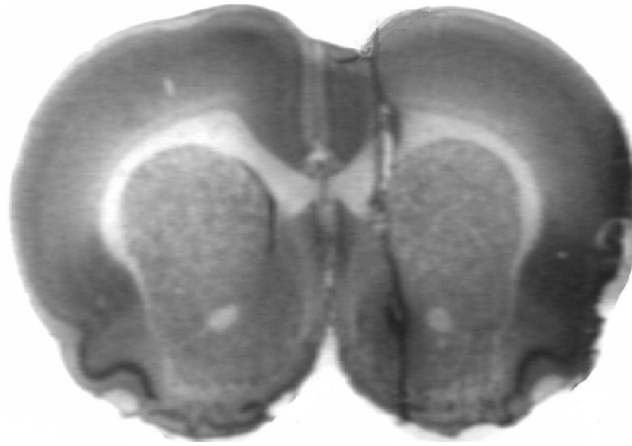
**Kuva 7.** Mikrodialyysilaitteiston kokoonpano. Pumppu pumpppaa perfuusionesteen kulkemaan aivoissa olevan koettimen läpi, josta se sitten kerätään talteen analysointia varten. Automaattinen fraktionkerääjä huolehtii asetetun ajan välein tapahtuvasta näytteenkeräysputken vaihtamisesta.

#### 9.4

##### Aivoleikkeiden teko

Kokeessa ollut rotta lopetettiin hiilidioksidilla ja aivot preparoitiin esille, jonka jälkeen ne laitettiin fiksoitumaan n. 4 % formaliniin vähintään yön yli. Fiksoiduista aivoista tehtiin  $100\ \mu\text{m}$  leikkeitä jäämikrotomilla koettimen paikan varmistamiseksi (Kuva 8). Leikkeet värjättiin thioniinillä (0,2 %, 2 min) ja peitettiin DPX:llä (BDH Laboratory Supplies, England). Värjätyistä leikkeistä määritettiin mikroskoipoimalla koettimen paikka käyttäen Paxinoksen ja Watsonin atlasia (Paxinos ja Watson 1982). Kriteereinä

hyväksymiselle pidettiin sitä, että vähintään puolet koettimen dialyysikalvosta oli ollut accumbens-tumakkeen kuoriosassa.



**Kuva 8.** Kuva tyypillisestä koettimen paikan tarkistamiseen käytetystä aivoleikkeestä. Accumbens-tumake on ympäristöönsä hieman tummempi alue leikkeen alaosassa olevien pienten vaaleiden *anteriorio commissureiden* ympärillä. Myös koettimen jättämä jälki kulkee sen läpi.

## 9.5

### Näytteiden analysointi

Mikrodialyysinäytteistä analysoitiin mitattavien aineiden pitoisuudet HPLC:llä. Näytteistä määritettiin dopamiinin (DA), 3,4-dihydroksifenyylietikkahapon (DOPAC), homovanilliinihapon (HVA) ja 5-hydroksi-indoliasetaattihapon (5-HIAA) pitoisuudet, käyttäen elektrokemiallista detektointia. Myös 5-hydroksitryptamiinin (5-HT eli serotoniini) pitoisuuksia mitattiin, mutta analyysilaitteiston optimoinnista dopamiinin mittaamiseen sekä serotoniinin pienestä pitoisuudesta johtuen nämä tulokset eivät olleet täysin luotettavia. 5-HT:n pitoisuuksia seuraamalla saatiin kuitenkin arvokasta tietoa kokeessa mahdollisesti syntyneistä virheellisistä tuloksista. Usein selvästi virheellinen mittaustulos näkyi epänormaalin korkeina tai matalina piikkeinä myös serotoniinin kohdalla, vaikka sen todellisista pitoisuuksista ei aina voitukaan olla täysin varmoja.

Kromatografialaitteisto koostui Hewlett Packard Series 1100 pumpusta, jäähdytettävästä autoinjektorista CMA/200 (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden) ja amperometrisestä detektorista Antec Intro (Antec, Leyden, Netherlands). Mitattavat aineet erotettiin LC-Packings Hypersill C18 ODS 3  $\mu\text{m}$  -kolonnilla (100 x 1,0 mm; LC-Packings, Amsterdam, Netherlands) käyttäen 55 mM fosfaattipuskuria (pH 3.11, 50,4 mM sitruunahappo, 0,15 mM EDTA, 0,30 mM OSA, 10 % metanolissa, kaikki reagenssit Merck tai Sigma). Virtausnopeus oli säädetty 22  $\mu\text{l}/\text{min}$ , jänniteen ollessa 0,7 V vs. Ag/AgCl.

Jokaisessa kromatografia-ajossa oli koenäytteiden lisäksi mukana vähintään kaksi standardisarjaa, joissa kussakin viisi erivahvuista standardia (3  $\mu\text{l}$  glutathioni-HCl + 21  $\mu\text{l}$  ko. standardia). Näiden avulla voitiin määrittää kunkin ajon amiinien retentioajat. Retentioajat olivat seuraavat: DA 8,2 min, DOPAC 9,3 min, 5-HIAA 13,8 min, 5-HT 18,4 min,

HVA 22,8 min. Kromatogrammit tallennettiin ja käsiteltiin käyttäen Waters 820 Maxima –ohjelmistoa (versio 3.31).

## 9.6

### Veren etanolipitoisuuden määrittäminen

Otetuista verinäytteistä määritettiin etanolipitoisuus kaasukromatografian avulla (Perkin-Elmer HS 100, GC Sigma 2000 Millennium, Norwalk, CT). Kolonnia (pituus 6 jalkaa, sisähalkaisija 1/8 tuumaa), joka oli pakattu 5 % Carbowax 20 M 60/80 Carbopack B:llä, käytettiin 75°C, liekki-ionisaatio-detektorin lämpötilan ollessa 140°C. Kantajakaasuna toimivan typen virtausnopeus oli säädetty 65 ml/min. Etanolipitoisuuksien kalibroimiseen käytettiin koepäivänä koepaikalla pipetoituja etanolistandardeja (18 mM EtOH 25 µl, H<sub>2</sub>O 225 µl) ja nollanäytteenä 250 µl:a vettä.

## 9.7

### Tulosten tilastollinen testaus

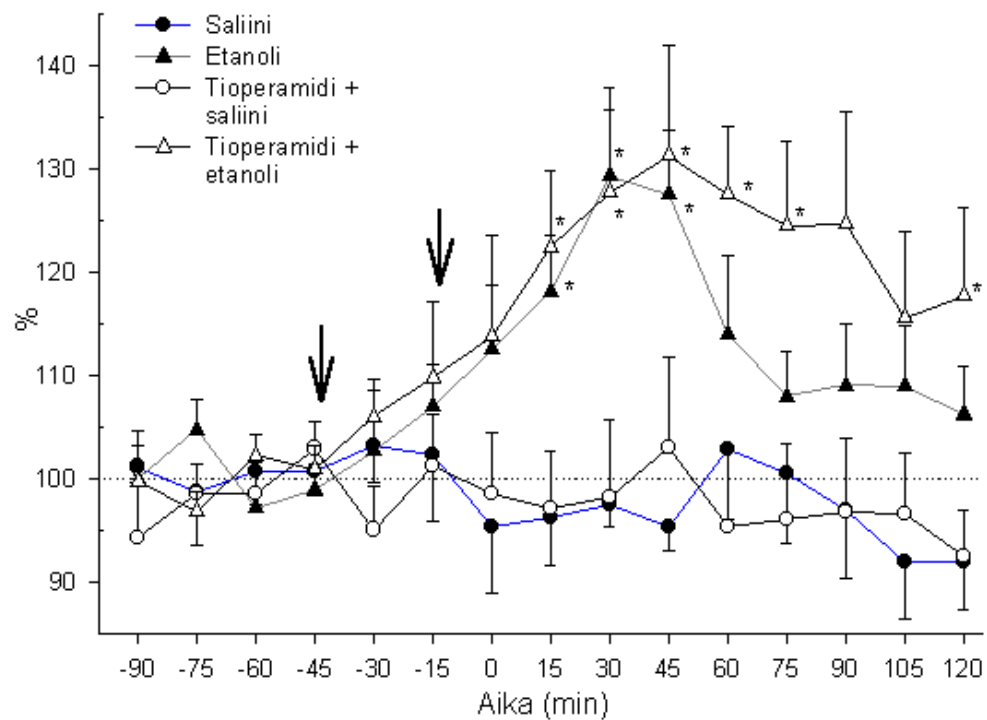
Saadut tulokset testattiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (2-suuntainen ANOVA) ja sen osoittaessa merkittävää eroa tehtiin post-hoc-testinä Student-Newman-Keuls –testi. S-N-K-testin avulla tutkittiin yksittäisten aikapisteiden mahdollisia eroja eri ryhmien välillä.

## 10

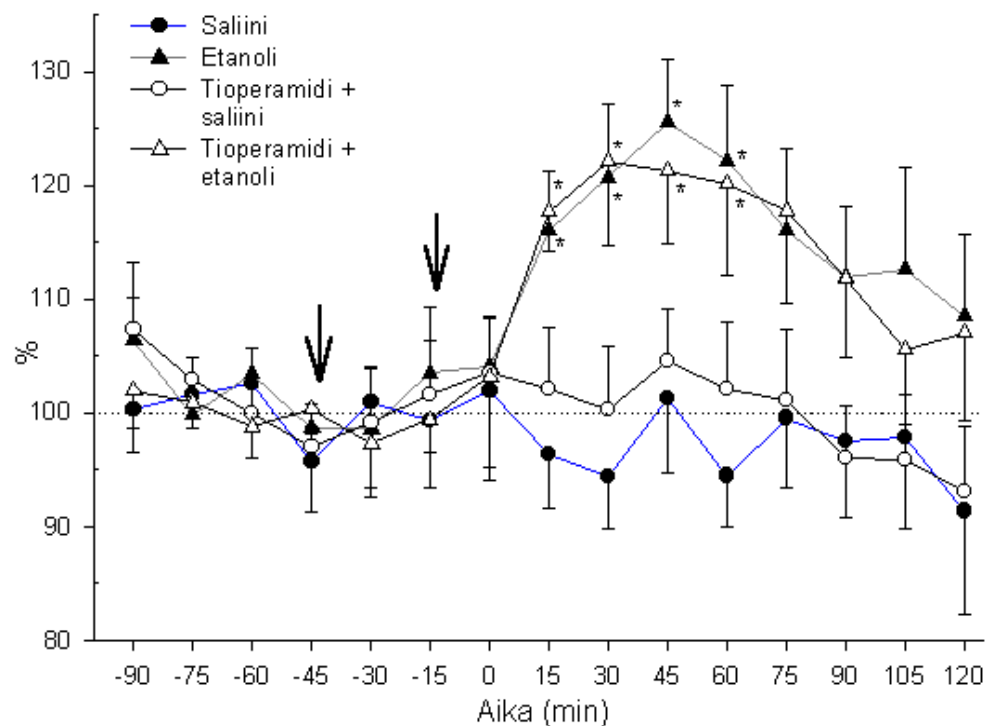
## TULOKSET

Näytteenkeräystekniikasta, analyysitekniikasta ja eläinten välisistä yksilöllisistä eroista johtuen dialysoitin sisältämät aineiden pitoisuudet eivät ole pitkässä koesarjassa välttämättä vertailukelpoisia. Sen vuoksi kaikissa tuloksissa todelliset pitoisuudet on muutettu prosenteiksi kunkin eläimen perustasoon verrattuna (perustaso = 100 %). Mikäli haluttaisiin tietää myös aineiden todelliset pitoisuudet luotettavasti, olisi huomattavasti enemmän kiinnitettävä huomiota koettimen saantoon, analysointiolosuhteiden samanlaisena pysymiseen ja kromatogrammien analysoinnin yhdenmukaisuuteen. Näistä jälkimmäisimmässä on noudatettu yhdenmukaista tapaa ja analysointiolosuhteiden eroavaisuuksista päästään eroon tai ne voidaan ottaa huomioon riittävällä standardien käytöllä. Koettimen saannolla tarkoitetaan sitä prosenttia, jonka koetin mitattavan aineen aivoissa olevasta pitoisuudesta kerää analysoitavaksi. Tämä vaihtelee koettimen käyttöiän kasvaessa. Prosenttiosuuksia vertailtaessa ei tällä kuitenkaan ole kovin suurta merkitystä ja tulosten vertailu helpottuu, kun ei pysyttäydytä todellisissa pitoisuuksissa. Lisäksi tutkimuksen kannalta mielenkiintoisimpia ovat juuri muutokset mitattujen aineiden määrissä, eivät niinkään niiden todelliset pitoisuudet.

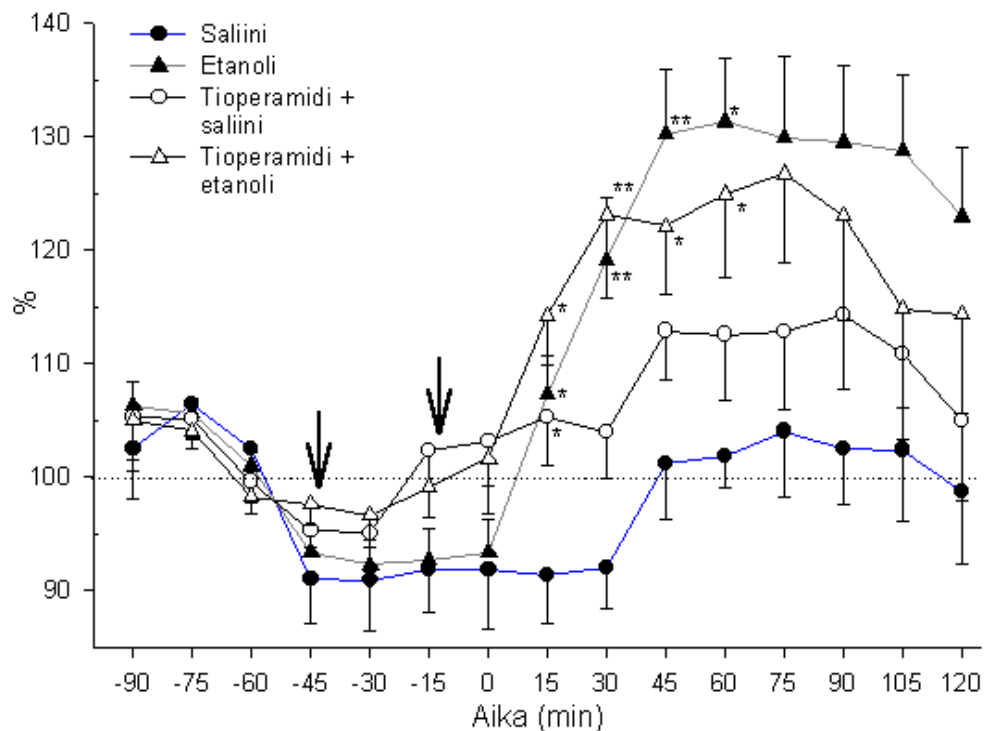
Kuudesta mitatusta perustason näytteestä saatiin mittauksia varten määritetyksi kunkin mitattavan amiinin silloinen perustaso. Perustason määrittämiseen käytettiin ideaalitalanteessa perustason kolmea viimeistä arvoa sikäli kun nämä olivat hyväksyttävissä rajoissa. Satunnaisten vaihteluiden poistamiseksi arvoja verrattiin myös kolmeen ensimmäiseen perustason näytteeseen. Jos jossakin tapauksessa esimerkiksi yksi arvo poikkesi merkittävästi havaitusta linjasta, otettiin tilalle keskiarvo ko. näytettä ennen ja jälkeen olevista näytteistä tai kaikista perustason muista näytteistä. Satunnaisesti näin tehtiin myös varsinaisen kokeen näytteiden tapauksessa. Tällöin arvona käytettiin ennen ja jälkeen kyseistä näytettä olevien arvojen keskiarvoa. Näin jouduttiin toimimaan toisinaan koetilanteessa tapahtuneiden, usein laitteistoon liittyvien, ongelmien ilmetessä. Seuraavissa kuvissa on otettu perustasosta mukaan vain pisteet kolmannelta eteenpäin (b3-b6).



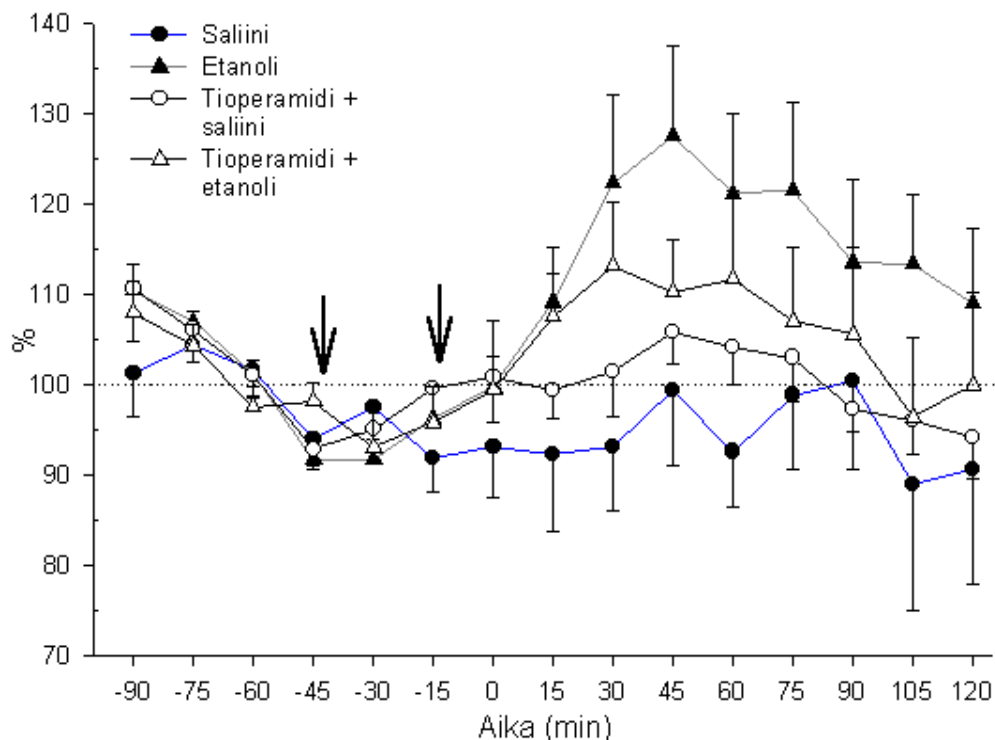
**Kuva 9a.** Tioperamidin ja etanolin vaikutus dopamiinipitoisuuteen accumbens-tumakkeessa. Dopamiinin pitoisuus on ilmoitettu prosentteina perustasosta koko mittausjakson aikana ( $0 \pm \text{SEM}$ ). Nuolet kertovat injektioiden antamishetken, ensimmäinen salini/tioperamidi toinen salini/etanoli. ( $p < 0,05$  saliniinryhmään verrattuna).



**Kuva 9b.** Tioperamidin ja etanolin vaikutus DOPAC:in pitoisuuteen accumbens-tumakkeessa. DOPAC:in pitoisuus on ilmoitettu prosentteina perustasosta koko mittausjakson aikana ( $0 \pm \text{SEM}$ ). Nuolet kertovat injektioiden antamishetken, ensimmäinen salini/tioperamidi toinen salini/etanoli. ( $p < 0,05$  saliniinryhmään verrattuna).



**Kuva 9c.** Tioperamidin ja etanolin vaikutus HVA:n pitoisuuteen accumbens-tumakkeessa. HVA:n pitoisuus on ilmoitettu prosentteina perustasosta koko mittausjakson aikana ( $0 \pm \text{SEM}$ ). Nuolet kertovat injektioiden antamishetken, ensimmäinen saliini/tioperamidi toinen saliini/etanoli. ( $p < 0,05$  ja ( $p < 0,01$  saliiniryhmään verrattuna).



**Kuva 9d.** Tioperamidin ja etanolin vaikutus 5-HIAA:n pitoisuuteen accumbens-tumakkeessa. 5-HIAA:n pitoisuus on ilmoitettu prosentteina perustasosta koko mittausjakson aikana ( $0 \pm \text{SEM}$ ). Nuolet kertovat injektioiden antamishetken, ensimmäinen saliini/tioperamidi toinen saliini/etanoli.

## 10.1

## Saliini + saliini

Kontrollina toimineen saliinin intraperitoneaalinen injektio (histaminergisia aineita vastaava määrä ensimmäisessä injektiossa ja 1,5 g/kg etanolia vastaava määrä toisessa) ei aiheuttanut merkittävää muutosta minkään mitatun amiinin määrässä. Dopamiinin ja DOPAC:in pitoisuudet perustasoon verrattuna olivat koko mittausjakson aikana  $98,4 \% \pm 0,9 \%$  ( $0 \pm \text{SEM}$ ,  $n=6-7$ ) (kuva 9a ja 9b). HVA:lla vastaavat arvot olivat  $98,1 \% \pm 1,5 \%$  (kuva 9c) ja 5-HIAA:lla  $96 \% \pm 1,2 \%$  (kuva 9d).

Kaasukromatografialla varmistettiin ettei eläinten verestä löytynyt jälkiä etanolista. Tämä toimi samalla myöskin kaasukromatografian toiminnan kontrollina yhdessä standardi- ja nollanäytteiden kanssa.

## 10.2

## Saliini + Etanoli

Etanolikontrolliryhmällä varmistettiin, että etanolin i.p-injektio nosti mitattujen aineiden pitoisuutta aiemmin havaitun kaltaisesti (Kiianmaa et al. 1995). Koska kontrollikokeita tehtiin yhtäaikaan varsinaisten kokeiden kanssa, voitiin niiden avulla myös arvioida saatujen tulosten luotettavuutta. Mikäli kontrollikokeissa havaittiin jotain tavallisuudesta poikkeavaa, käytiin läpi kaikki tehdyn kokeen vaiheet ja varmistettiin ettei niiden suorituksessa ollut tapahtunut mitään poikkeavaa. Kaiken lisäksi työskennellessä elävien eläinten kanssa ei aina hyvälläkään koe-suunnittelulla ja huolellisuudella päästä toivottuihin tuloksiin. Tällöin kontrollikokeet olivat korvaamaton apu kokeen suoritustekniikkaan kohdistuvien epäilysten poissulkemisessa.

Ensimmäisenä injektiona toimineen saliinin i.p-injektion jälkeen ei havaittu tilastollisesti merkitsevää muutosta mitattujen amiinien perustasosta (taulukko 1). Pieni dopamiinin nousu perustasoon verrattuna melkein kaikissa ryhmissä saattaa johtua lähinnä kolmesta seikasta:

- 1) koettimen liikahtaminen eläintä käsiteltäessä saattaa vaurioittaa joitakin sen lähetyvillä olevia soluja, aiheuttaen soluista ulos vuotavasta dopamiinista johtuvan nousun
- 2) eläin kokee injektiotapahtuman uutena ja mielenkiintoisena vaikka ei pitäisikään sitä erityisen miellyttävänä ja tämä nostaa dopamiinin määrää
- 3) eläin on stressaantunut injektion johdosta jolloin dopamiinin pitoisuus nousee.

(Nurmi 1998, Di Chiara 1995).

Toisaalta jälkimmäistä teoriaa ei tue se havainto, että totutettaessa eläin injisointitapahtumaan harjoitusinjektioilla, ei havaittu mitään muutosta verrattuna eläimiin joille injisointikokemus oli täysin uusi. Kaikkia eläimiä oli muuten käsitelty jokseenkin yhtä paljon ja ne suhtautuivat koetta tehdessä käsittelyyn useimmiten hyvin heikosti vastustaen tai olivat reagoimatta sen enempää myötämielisesti kuin vastahakoisestikaan.



**Taulukko 1.** Mitattujen monoamiinien ja niiden metaboliittien pitoisuudet prosentteina perustasosta ensimmäisen injektion jälkeen kaikissa ryhmissä (keskiarvo kahdesta injektioiden välisestä näytteestä  $\pm$  SEM). N=6–14.

	Dopamiini %	DOPAC %	HVA %	5-HIAA %
Saliini	102,7 $\pm$ 0,4	100,1 $\pm$ 0,8	91,4 $\pm$ 1,5	94,7 $\pm$ 2,8
Etanoli	104,8 $\pm$ 2,1	101,1 $\pm$ 2,5	92,5 $\pm$ 0,2	93,9 $\pm$ 2,3
Tioperamidi + Saliini	98,2 $\pm$ 3,1	100,4 $\pm$ 1,2	98,7 $\pm$ 3,7	97,4 $\pm$ 2,3
Tioperamidi + Etanoli	107,8 $\pm$ 1,9	98,4 $\pm$ 1,0	97,9 $\pm$ 1,2	94,4 $\pm$ 1,4

Toisessa injektiossa eläin sai etanolia (12 % w/v) 1,5 g/kg i.p-injektiona. Etanoli nosti DA:n, DOPAC:in ja HVA:n pitoisuuksia saliniryhmään verrattuna selvästi ( $p < 0,05$ ). Suurimmat pitoisuudet havaittiin 30 - 60 minuutin kuluttua injektioista (taulukko 2), jonka jälkeen ne alkoivat laskea hiljalleen kokeen lopettamiseen saakka. Etanolin vaikutus oli helposti havaittavissa myös eläinten käyttäytymisestä. Ne olivat varsin nopeasti injektion jälkeen selvästi humalassa. Mikäli mitään muutosta käyttäytymisessä ei olisi havaittu olisi ollut syytä tarkistaa injektion onnistuminen. Veren etanolipitoisuudet varmistettiin myös kaasukromatografian avulla. Tällöin voitiin olla varmoja, että annettu etanoli oli myöskin imeytynyt. Esimerkiksi eläimen ollessa hyvin stressaantunut, injisoidun etanolin imeytyminen on normaalia huomattavasti heikompaa ja hitaampaa. Loppukokeen ajan eläimet tavallisesti nukkuivat ja käyttäytyivät muutenkin erittäin rauhallisesti.

**Taulukko 2.** Mitattujen amiinien huippuarvot prosentteina perustasosta ( $0 \pm$  SEM) etanolia saaneissa ryhmissä sekä korkeimman arvon antaneen mittauspisteen aika minuutteina etanolin injektion jälkeen (etanoliryhmä n=9–14, tioperamidiryhmä n=7–10).

	Dopamiini	DOPAC	HVA	5-HIAA
Etanoli	129,3 $\pm$ 8,5 % (30 min)	125,5 $\pm$ 5,5 % (45 min)	131,3 $\pm$ 5,6 % (60 min)	127,5 $\pm$ 9,9 % (45 min)
Tioperamidi + Etanoli	131,3 $\pm$ 10,7 % (45 min)	122,1 $\pm$ 7,4 % (30 min)	126,7 $\pm$ 7,9 % (75 min)	113,1 $\pm$ 7,0 % (30 min)

Saliinia etanolin sijaan toisessa injektiossa saaneiden ryhmien maksimi-arvot eivät sijoitu etanoliryhmien tapaan mihinkään määrättyyn paikkaan, vaan ovat satunnaisesti jakautuneet koko mittausalueelle eri aineiden kohdalla (kuvat 9a, 9b, 9c ja 9d). Poikkeuksena HVA:n maksimi-arvot, jotka näyttäisivät myös näissä ryhmissä sijoittuvan samaan aikajaksoon kuin muidenkin ryhmien huiput.

Kaasukromatografilla mitatut veren etanolipitoisuudet löytyvät taulukosta 3. Annettuun etanoliannokseen nähden mitatut arvot ovat aivan odotetun kaltaisia.

**Taulukko 3.** Etanolia saaneiden koeryhmien verestä mitattu etanolipitoisuus ( $0 \pm \text{SEM}$ ) 30 minuutin kuluttua etanolin injektioista. Etanoliryhmä  $n=16$ , tioperamidiryhmä  $n=9$ .

Veren etanolipitoisuus mM	
Etanoli	$26,2 \pm 1,2$
Tioperamidi + Etanoli	$21,8 \pm 1,7^*$

### 10.3

#### Tioperamidi + saliini

Tähän ryhmään kuuluvat eläimet saivat ensimmäisessä injektiossa histamiini  $H_3$ -reseptorin antagonistia, tioperamidia, 10 mg/kg intra-peritoneaalisesti. Tästä puolen tunnin kuluttua ne saivat toisessa injektiossa saliinia painon mukaan suhteutettuna saman määrän kuin olisivat saaneet etanoliakin. Pelkän tioperamidin toimiessa vaikuttavana aineena ei accumbens-tumakkeesta mitatuissa amiineissa havaittu mitään merkittävää muutosta saliniiryhmään verrattuna.

Dopamiinin, DOPAC:in ja 5-HIAA:n pitoisuudet olivat hyvin lähellä saliini-kontrolliryhmän tuloksia (DA  $97,6 \% \pm 0,8 \%$ , DOPAC  $100,4 \% \pm 1,0 \%$ , 5-HIAA  $100,5 \% \pm 1,3 \%$ ,  $n=9-11$ ). HVA:n pitoisuudessa havaittiin pieni, mutta ei tilastollisesti merkitsevä nousu (HVA  $106 \% \pm 1,6 \%$ ,  $p=0,18$ ). Nousu ajoittui noin 60 minuutin päähän saliinin injektioista, sen sijaan tioperamidin injektion jälkeen ei ollut havaittavissa mitään välitöntä vaikutusta (taulukko 1). Muiden mitattavien aineiden kohdalla saliinin injektio ei muuttanut käyrän aluksi havaittua suuntaa.

### 10.4

#### Tioperamidi + etanoli

Tämän ryhmän eläimet saivat ensimmäisessä injektiossa tioperamidia 10 mg/kg i.p ja toisessa etanolia (12 % w/v) 1,5 g/kg. Tioperamidin injektion jälkeen ei ollut havaittavissa merkitsevää eroa mihinkään aiemmin käsitellyistä ryhmistä (taulukko 1).

Puolen tunnin kuluttua ensimmäisestä injektioista annettu etanoli aiheutti samankaltaisen muutoksen kuin oli saliini + etanoli –ryhmässäkin (kuvat 9a, 9b, 9c ja 9d). Dopamiinin kohdalla ero oli merkitsevä verrattuna sekä saliini- että tioperamidi + saliini –ryhmiin ( $p<0,01$  ja  $p<0,05$ ). DOPAC ja HVA puolestaan erosivat vain saliniiryhmästä ( $p<0,05$ ). 5-HIAA ei eronnut merkitsevästi kummastakaan ryhmästä. Kunkin mitattavan amiinin nousun huippu ajoittui noin 45–75 minuutin päähän etanolin injektioista. Myöskin mitatut maksimiarvot olivat samaa luokkaa kuin saliini + etanoli –kontrolliryhmässä (taulukko 2).

Etanolin ja tioperamidin yhdessä aikaansaamassa vaikutuksessa tai sen keston pidentymisessä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää muutosta

pelkkää etanolia saaneeseen ryhmään verrattuna. Aikavälillä 75–135 min etanolin injektion jälkeen dopamiinin pitoisuudet näiden kahden ryhmän välillä näyttäisivät eroavan kaikkein eniten ( $p \approx 0,1$ ). Saliiniryhmään verrattuna merkitsevä ero säilyy kuitenkin tioperamidia ja etanolia saaneessa ryhmässä selvästi pidempään.

Veren etanolipitoisuudet olivat tässä ryhmässä  $21,8 \text{ mM} \pm 1,7 \text{ mM}$  (taulukko 3). Tämä eroaa pelkkää etanolia saaneiden eläinten veren etanolipitoisuudesta ( $p < 0,05$ ). Eläimistä mitatut etanolipitoisuudet ovat kuitenkin tässäkin ryhmässä annokseen nähden odotettuja. Yksilöt joiden veren etanolipitoisuus ei jostain syystä noussut odotetusti on poistettu kaikista tuloksista.

## 10.5

### Ryhmienväliset erot

5-HIAA:ta lukuunottamatta eri koeryhmien accumbens-tumakkeesta mitatuissa amiinipitoisuuksissa ryhmien välillä oli selviä eroja. Etanoli- ja tioperamidi + etanoli –ryhmät erosivat merkitsevästi saliiniryhmästä sekä dopamiinin, DOPAC:in että HVA:n tapauksissa koko mittausjaksoa tutkittaessa (DA  $p < 0,01$  ja DOPAC sekä HVA  $p < 0,05$ ). Tioperamidi + saliini –ryhmään merkitsevää eroa oli vain dopamiinin kohdalla ( $p < 0,05$ ).

### 10.5.1

#### Dopamiini

Suurimmat erot dopamiinin pitoisuudessa sijoittuvat ajallisesti maksimi-arvon molemmiin puolin noin 15–60 minuutin päähän etanolin injektioista. Tioperamidia ja etanolia saaneen ryhmän tulokset erosivat tämän lisäksi vielä ajalla 60–90 min merkittävästi saliiniryhmästä (kuva 9a).

### 10.5.2

#### DOPAC

DOPAC:in kohdalla erot ryhmien välillä noudattivat samaa linjaa kuin dopamiininkin tapauksessa. Erot olivat suurimmillaan 15–75 minuutin kuluttua etanolin antamisesta. DOPAC:in pitoisuus ei sen sijaan eronnut yhtä selvästi pelkkää etanolia ja etanolia sekä tioperamidia saaneiden ryhmien välillä. Pelkkää tioperamidia saanut ryhmä ei eronnut kummastakaan varsinaisesta koeryhmästä merkitsevästi (kuva 9b).

### 10.5.3

#### HVA

Merkitsevät erot myöskin tässä ryhmässä sijoittuivat samaan ajanjaksoon kuin aiempien aineiden kohdalla (n. 15–60 minuuttia etanolin injektioista). Kumpikaan etanolia saanut ryhmä ei eronnut HVA:n osalta muista kuin pelkkää saliinia saaneesta ryhmästä ( $p < 0,05$ ). HVA:n pitoisuuden muutokset noudattavat kaikissa koeryhmissä samankaltaista linjaa, joskin etanolia saaneiden ryhmien käyrät kulkevat muita selvästi ylempänä. Injektiot näyttäisivät itsessään nostavan HVA:n pitoisuutta hieman, riippumatta injisoitavan aineen laadusta (kuva 9c). Etanoli vain näyttäisi voimistavan tätä tapahtumaa huomattavasti.

### 10.5.4

#### 5-HIAA

5-HIAA:n pitoisuudet eivät eroa ryhmien välillä toisistaan merkitsevästi. Ero on lähes merkitsevä ( $p \approx 0,06$ ) samalla aikavälillä kuin suurimmat erot aiemmin käsiteltyjen aineiden kohdalla. Myös maksimi-arvot sijoittuvat samaan aikaan muiden aineiden kanssa (kuva 9d).

## 10.6

## Dialysaatin sisältämät pitoisuudet

Jo aiemmin mainituista syistä seuraavaan taulukkoon ei ole otettu mukaan dopamiinin eikä serotoniin todellisia dialysaatin sisältämiä pitoisuuksia. DOPAC:in, HVA:n ja 5-HIAA:n todelliset pitoisuudet on laskettu kolmen perustason laskemiseen käytetyn pisteen keskiarvosta.

**Taulukko 4. DOPAC:in, HVA:n ja 5-HIAA:n mitatut pitoisuudet perustason aikana ( $0 \pm \text{SEM}$ ).**

	DOPAC nM	HVA nM	5-HIAA nM
Saliini	$330 \pm 60$	$130 \pm 20$	$100 \pm 10$
Etanoli	$640 \pm 50$	$140 \pm 10$	$120 \pm 10$
Tioperamidi + Saliini	$540 \pm 70$	$130 \pm 20$	$110 \pm 20$
Tioperamidi + Etanoli	$470 \pm 60$	$120 \pm 10$	$90 \pm 10$
Kaikki ryhmät	$500 \pm 60$	$130 \pm 15$	$110 \pm 10$

Taulukkoa luettaessa on syytä muistaa, että aineen mitattu pitoisuus antaa vain viitteellistä tietoa aivojen sisältämästä todellisesta pitoisuudesta, sillä koettimen kullonin saanto on aina huomattavasti pienempi kuin 100 %. Niinpä saatu tulos on vain jokin prosenttiosuus ekstrasellulaaritalan todellisesta pitoisuudesta. Mitattu tulos ilmaisee kuitenkin varsin hyvin aivoissa vallitsevan pitoisuuden suuruusluokan ja kertoo mitattujen aineiden keskinäisistä pitoisuussuhteista ekstrasellulaaritalassa.

## 11

### TULOSTEN TARKASTELU

#### 11.1

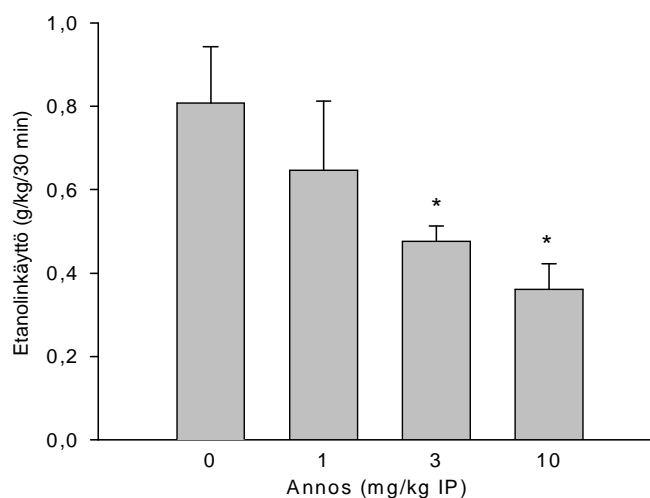
##### Etanolin vaikutus

Kokeista saadut tulokset osoittavat, että intraperitoneaalisesti annosteltu etanoli nostaa dopamiinin, DOPAC:in ja HVA:n pitoisuuksia. Tämä tulos on yhdenmukainen useiden aiempien tutkimusten kanssa, joskin havaittu nousu perustasoon verrattuna jäikin muita tutkimuksia pienemmäksi (Kiianmaa et al. 1995, Honkanen et al. 1994, Weiss et al. 1993). Ero oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä. Tämä nousu johtunee dopamiinin lisääntyneestä erityksestä ja metaboliasta. 5-HIAA:n tapauksessa tilastollisesti merkitsevää eroa ei havaittu. Myös aiemmissa tutkimuksissa 5-HIAA:n ja etanolin yhteys on ollut hankalasti osoitettavissa ja mahdollisesti etanolilla ei ole merkittävää vaikutusta sen muodostumiseen (Kiianmaa et al. 1995). Syynä voi olla myös aiemmin todettu 5-HIAA:n soveltuvuus pikemmin solunsisäisten metaboliatapahtumien kuvaamiseen kuin hermovälityksen aktiivisuuden ilmaisemiseen (Kalén et al. 1988).

#### 11.2

##### Tioperamidin vaikutus

Tioperamidilla ei yksinään ollut vaikutusta dopamiinin pitoisuuteen. Aiemmin tehdyssä tutkimuksessa tioperamidilla ei oltu havaittu olevan yksinään vaikutusta eläinten liikeaktiivisuuteen (Hyytiä, Julkaisematon tieto). Sen sijaan toisessa tutkimuksessa havaittiin tioperamidin vaikuttavan AA-rottien vapaaehtoiseen alkoholinkäyttöön (Kuva 10). Tässä tutkimuksessa tioperamidi vähensi annoksen mukaisesti eläinten alkoholinkulutusta. Vastaavasti histamiini H<sub>3</sub>-reseptorin agonistin antaminen lisäsi eläinten alkoholinkulutusta. Yksi mahdollinen selitys havaittuun tulokseen olisi ollut dopamiinin erityksen lisääntyminen accumbens-tumakkeessa kun tioperamidia annetaan yhdessä etanolin kanssa. Nyt saadut tutkimustulokset eivät kuitenkaan tue tätä oletusta vaan viittaisivat jonkin muun mekanismin olevan havaitun käyttäytymismuutoksen takana.



**Kuva 10.** Tioperamidin vaikutus vapaaehtoiseen alkoholinkäyttöön AA-rotilla. (  $p < 0,05$  verrattuna kontrolliryhmään.

Pelkällä tioperamidilla on havaittu olevan vaikutusta ainakin veden- ja ruuankulutukseen, joten luultavasti joitakin muutoksia tapahtuu myös aivojen välittäjäainepitoisuuksien tasolla (Kraly et al. 1995, Clapham ja Kilpatrick 1993). Nämä muutokset eivät kuitenkaan välttämättä välity aivojen mesolimbisen dopamiiniradan välityksellä tai ovat liian pieniä havaittaviksi nykyisillä tutkimusmenetelmillä. Ainakaan tämä tutkimus ei kyennyt osoittamaan tilastollisesti merkitseviä muutoksia accumbens-tumakkeen dopamiinin ja sen metaboliittien määrissä, kun eläimille annettiin pelkkää tioperamidia.

### 11.2.1

#### Tioperamidin vaikutus eläinten liikeaktiivisuuteen

Tuloksissa oli havaittavissa samankaltaista suuntausta kuin on aiemmin huomattu olevan tioperamidilla yhdessä amfetamiinin ja kokaiinin kanssa. Tioperamidi potentoi näiden aineiden liikeaktiivisuutta lisäävää vaikutusta huomattavasti ja samalla lisää näiden aineiden vaikutuksen kestoja. Tämän muutoksen taustalla on mitä ilmeisimmin dopaminergisen hermovälityksen muutokset. Näiden aineiden vaikutusmekanismi kytkeytyy etanolia selvemmin juuri mesolimbisen dopamiiniradan toiminnan säätelyyn. Mahdollisesti tässä tutkimuksessa ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä myös siitä syystä, että tuloksissa on varsin paljon yksilöiden välistä vaihtelua. Yksilöiden välisen vaihtelun pienentämiseksi ja sitä myöten tulosten luotettavuuden parantamiseksi olisi tehtävä enemmän kokeita kuin tämän tutkimuksen yhteydessä on ollut mahdollista. Keskiarvoista piirrettyssä kuvassa on kuitenkin havaittavissa samankaltaista aineiden yhteisvaikutuksen aikaansaamaa vaikutuksen keston pidentymistä (kuva 9a). Samoin tioperamidi + etanoli –ryhmän merkitsevä ero dopamiinin määrässä saliniiniryhmään verrattuna säilyy pelkkää etanolia saanutta ryhmää selvästi pidempään. Vaikutuksen pidentyminen voi siis tämän tutkimuksen valossa olla hyvinkin seurausta pelkkää huumetta pidempään kestävästä dopamiinin pitoisuuden noususta, vaikka tilastollisesti merkitsevää eroa ei nyt havaittukaan.

Dopamiinin huippuarvot pelkästään etanolia saaneilla ja etanolia sekä tioperamidia saaneilla eläimillä, ovat lähes yhtä suuret. Aikaisemmin havaittua alkoholin juomisen vähenemistä AA-rotilla ei siis voitane selittää pelkästään tioperamidin mahdollisella kyvyllä kasvattaa etanolin aikaansaamaa dopamiinin vapautumista. Tätä ei myöskään tue se havainto, että aiemmassa tutkimuksessa tioperamidin merkittävin vaikutus oli havaittavissa jo ensimmäisten 5–10 minuutin kuluttua alkoholinkäytön alusta ja ainoa nyt tehdyssä tutkimuksessa havaittu ero ryhmien välillä oli nähtävissä vasta noin tunnin kuluttua etanolin injektioista (Kuva 9a).

### 11.2.2

#### Tioperamidin vaikutus dopaminergiseen viestinvälitykseen

Kuinka sitten tioperamidilla voi olla vaikutusta havaittuun dopamiinin pitoisuuden kasvuun ja mahdollisesti tämän tapahtuman keston yhdessä etanolin kanssa annettuna, mikäli sillä ei ole yksinään vaikutusta? Tähän on tietysti useita mahdollisia selityksiä ja pelkästään tämän tutkimuksen perusteella ei voida antaa vastausta siihen mikä tämän tapahtuman taustalla olisi. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli pelkästään selvittää

voiko aiemmin havaitut liikeaktiivisuuden lisääntyminen ja alkoholin juomisen väheneminen selittyä dopamiinin erityksen lisääntymisellä. Jos kuitenkin spekuloidaan tuloksilla hieman enemmän ja otetaan mukaan aiemmista tutkimuksista saatua tietoa on mahdollista esittää joitakin mahdollisia tapahtumia kuvatun ilmiön taustaksi.

Tioperamidin vaikutus kohdistuu histamiini  $H_3$ -reseptorien toiminnan estämiseen. Nämä reseptorithan puolestaan toimivat soluissa autoreseptoreina säädellen sekä histamiinin että monien muiden välittäjäaineiden eritystä (Hill et al. 1997, Arrang et al. 1983, Chronister et al. 1982). Tämän reseptorin toiminnan estämisen tulisi siten johtaa sen kohteena olevan välittäjäaineen erityksen kasvamiseen ja samalla myös histamiinin erityksen kasvamiseen (Cooper et al. 1996). Normaalisti samanaikaisesti kohteena olevan välittäjäaineen vapautuessa vapautuu myös histamiinia joka sitoutuu muiden vaikutustensa ohella myös autoreseptoriinsa ja pienentää siten omaa ja kohdevälittäjäaineen vapautumista. Tämä ei kuitenkaan vielä selitä sitä, miksi lisääntynyttä dopamiinin eritystä ei havaita pelkästään tioperamidia käyttämällä. Dopamiiniahon eritetään ilman keinotekoisia ärsykeitäkin, kuten etanolia tai huumeita, ja tämäkin erityks oletettavasti kasvaisi mikäli sitä ei säädeltäisi normaalisti. Tioperamidin vaikutus kohdistuu siis johonkin tapahtumaan, joka on seurausta lisääntyneestä etanolin aikaansaamasta dopamiinin vapautumisesta. Mahdollisesti jokin presynaptinen tapahtuma estää vapautuneen dopamiinin takaisinoton soluihin, lisää tai ylläpitää sen eritystä tai muuttaa metaboliaa. Koska tehdyssä tutkimuksessa ei havaittu muutoksia erittyneen dopamiinin määrässä on hyvin myös mahdollista, että tämä tioperamidin aikaansaama vaikutus kohdistuisi jotenkin dopamiini-reseptorin toiminnan säätelyyn. Yhtäläisyyttä tiettyjen dopamiini- ja histamiinireseptorityyppien välillä onkin esitetty löytyvän (Schlicker et al. 1993).

Tioperamidi näyttäisi vaativan jonkin muun aineen kasvattamaan vapautuvan dopamiinin määrää ennen kuin se kykenee muuttamaan jotain tätä seuraavaa tapahtumaa. Itsessään sillä ei näyttäisi olevan kykyä nostaa vapautuvan dopamiinin määrää. Dopamiinin kuten useiden muidenkin välittäjäaineen kohtalo on erityksensä jälkeen hyvin tarkasti ohjattua, jotta kyseinen aine voisi toimia riittävän valikoidusti aivojen viestinvälityksessä. Tästä syystä on hankala ryhtyä arvailemaan tioperamidin ja lopulta histamiini  $H_3$ -reseptorin toiminnan estämisen vaikutusmekanismia pelkästään yhden osa-alueen tutkimuksen perusteella.

### 11.3

#### Veren alkoholipitoisuudet

Etanolia saaneiden eläinten veren alkoholipitoisuuden välillä havaittu merkitsevä ero oli mielenkiintoinen havainto. Ero ei voi johtua pelkästään koeteknisistä syistä, sillä riittävät kontrollit ja se, että kumpaakin etanoliryhmää sekä saliniiryhmiä on tehty sattumanvaraisessa järjestyksessä sulkee pois systemaattisen virheen mahdollisuuden yksittäisen ryhmän sisällä. Sinänsä tämä havainto on mahdollinen, sillä histamiinillahon on tunnetusti hyvin laaja-alaisia vaikutuksia elimistössä. Histamiini  $H_3$ -reseptoreita on osoitettu olevan ainakin ohutsuolessa, keuhkoissa ja

haimassa, joten ei ole yllättävää, jos sen metabolian muuttamisella on myös perifeerisiä vaikutuksia (Hill et al. 1997). Samoin metabolian yhteneväisyydet etanolin kanssa voivat vaikuttaa tähän, joskin niiden vaikutus ei liene kovin suuri.

Pelkkää etanolia saanutta ryhmää alhaisempi veren etanolipitoisuus tioperamidiryhmässä voi johtua ainakin neljästä seikasta:

- 1) etanolin imeytyminen on hitaampaa kun elimistössä on tioperamidia
- 2) etanolin palaminen on nopeampaa ja se on poistunut elimistöstä ennen etanolipitoisuuden mittausta
- 3) eläinten rasvaprosentti on erilainen ja sitä myöten etanolin jakaantuminen elimistöön poikkeaa yksilöiden välillä
- 4) etanoli on jakautunut elimistöön jollakin normaalista poikkeavalla tavalla, jolloin sen konsentraatio veressä on pienempi.

Ensimmäiseen vaihtoehtoon on vaikea saada varmistusta vain yhden etanolimäärityksen avulla, toinen taas vaikuttaa epätodennäköiseltä siinä valossa, että veren etanolipitoisuus mitattiin jo puolen tunnin kuluttua injektioista, joten kovin merkittävää poistumista elimistöstä ei voi olla tapahtunut. Kolmas vaihtoehto on kaikkein todennäköisin ja kahden etanolia saaneen ryhmän välillä olikin pieni painoero (keskimäärin noin 40 g). Pelkkää etanolia saaneen ryhmän eläinten rasvaprosentti on siten luultavasti korkeampi ja siitä johtuen injisoitu etanolimäärä on suurempi kehon vesipitoisuuteen verrattuna. Neljanteen vaihtoehtoon on vaikea keksiä mitään tapahtumaa, joka aiheuttaisi niin selvän eron kuin havaittiin. Esimerkiksi poistuminen virtsan mukana normaalia enemmän voisi sopia tähän kategoriaan.

#### 11.4

##### Loppuyhteenveto

Tehty tutkimus onnistui vastaamaan jokseenkin hyvin ennakkoon asetettuihin kysymyksiin nimenomaan mahdollisesta dopamiinin osallisuudesta jo aiemmin mainittuihin liikeaktiivisuutta ja etanolinkäyttöä sääteleviin tapahtumiin. Nyt saatu tulos ei tue teoriaa, jossa muuttunutta etanolikäyttöä yhdessä tioperamidin kanssa annettuna voitaisiin selittää pelkästään erittyneen dopamiinin määrän muutoksilla. Sen sijaan aiemmin havaittu liikeaktiivisuuden kasvu voi hyvinkin olla seurausta pidentyneestä dopamiinin erityksen noususta *accumbens*-tumakkeessa tioperamidin johdosta. Molempiin havaintoihin voi tuki olla osallisena monia muitakin mekanismeja ja näiden osuutta on selvitettävä ennen kuin asia voidaan lopullisesti kaikkia yksityiskohtiaan myöten saada selville.



**12****KIITOKSET**

Haluaisin kiittää Kansanterveyslaitoksen alkoholitutkimusyksikköä ja erityisesti sen esimiestä, työnohjaajaani Kalervo Kiianmaata tiloista, materiaalista ja mahdollisuudesta toteuttaa tämä tutkielma tiloissanne. Kiitos myös Leena Tanner-Väisäselle, opastuksesta, neuvoista ja ennenkaikkea ajastasi, jota kiireistäsi huolimatta tuntui aina löytyvän myös minulle. Kiitos Pirkko Johanssonille saamistani neuvoista ja tasavertaisesta suhtautumisesta graduntekijään. Kiitokset Päivi Tuomaiselle lukemattomista vastauksista laitteiston ja menetelmien osalta sekä vertailevista keskusteluista eri analyysimetodien hyödyistä ja haitoista. Kiitos vielä Petri Hyytiälle vapaaehtoisesta työpanoksestasi tulosteni parissa.

Erityiskiitokset taustajoukkona toimineelle Katille niin hyvän mielialan ylläpitäjänä kuin suuresta työstäsi tutkielmani kirjoitusasun ja oikeinkirjoituksen parissa.

## 13

**LÄHDELUETTELO**

- Alho H.  
1998 **Alkoholiriippuvuuden lääkehoito.** Päihdelääketiede, 224–230, Kustannus Oy Duodecim, Jyväskylä, ISBN 951-8917-99-X.
- Arrang J., Garbarg M., Schwartz J.  
1983 **Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor.** Nature, Vol. 302, No. 5911, 832–837, April 28.
- Benveniste H.  
1989 **Brain microdialysis.** Journal of Neurochemistry, Vol. 52, No. 6, 1667–1679.
- Chronister R. B., Palmer G. C.,  
Defrance J. F., Sikes R., Hubbard J.  
1982 **Histamine: correlative studies in nucleus accumbens.** Journal of Neurobiology, Vol. 13, No. 1, 23–37, January.
- Clapham J., Kilpatrick G. J.  
1993 **Histamine H3 receptor-mediated modulation of water consumption in the rat.** European Journal of Pharmacology, Vol. 232, No. 1, 99–103, February 23.
- Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H.  
1996 **The biochemical basis of neuropharmacology.** Oxford University Press, New York
- De Keyser J.  
1993 **Subtypes and localization of dopamine receptors in human brain.** Neurochemistry International, Vol. 22, No. 2, 83–93.
- Di Chiara G.  
1997 **Alcohol and glutamate.** Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 108–114.
- Di Chiara G.  
1995 **The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation.** Drug and Alcohol Dependence, No. 38, 95–137
- Fleckenstein A. E., Moore K. E.,  
Lookingland K. J.  
1993 **Activation of mesolimbic dopaminergic neurons following central administration of histamine is mediated by H<sub>1</sub> receptors.** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 347, 50–54.
- Froehlich J. C.  
1997 **Opioid peptides.** . Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 132–136.
- Garris P. A., Kilpatrick M., Bunin M.  
1999 **Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation.** Nature, Vol. 398, 67–69, March 4.

- Gonzales R. A., Weiss F.  
1998  
**Suppression of ethanol-reinforced behavior by Naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens.** The Journal of Neuroscience, 18(24), 10663–10671, December 15.
- Gonzales R. A., Jaworski J. N.  
1997  
**Alcohol and dopamine.** Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 120–127.
- Hansen D. K., Davies M. I., Lunte S., Lunte C. E.  
1999  
**Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling.** Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 88, No. 1, 14–27, January.
- Hill S., Ganellin C., Timmerman H., Schwartz J., Shankley N., Young J., Schunack W., Levi R., Haas L.  
1997  
**International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors.** Pharmacological Reviews, Vol. 49, No 3, 253–278.
- Honkanen A.  
1999  
**Modulation of brain dopaminergic neurotransmission in alcohol-preferring rats by alcohol and opioids.** Väitöskirja, Dissertationes Biocentri Viikki Universitas Helsingiensis, 15/1999.
- Honkanen A., Hyytiä P., Korpi E., Ahtee L.  
1999a  
**Effects of morphine on metabolism of dopamine and serotonin in brains of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats.** Alcohol, Vol. 18, No. 1, 3–10.
- Honkanen A., Mikkola J., Korpi E., Hyytiä P., Seppälä T., Ahtee L.  
1999b  
**Enhanced morphine- and cocaine-induced behavioral sensitization in alcohol-preferring AA rats.** Psychopharmacology, Vol. 142, 244–252.
- Honkanen A., Ahtee L., Korpi E.  
1997  
**Voluntary alcohol drinking selectively accelerates dopamine release in the ventral striatum as reflected by 3-methoxytyramine levels.** Brain Research, Vol. 774, 207–210.
- Honkanen A., Piepponen T., Ahtee L.  
1994  
**Morphine-stimulated metabolism of striatal and limbic dopamine is dissimilarly sensitized in rats upon withdrawal from chronic morphine treatment.** Neuroscience Letters, Vol. 180, 119–122.
- Hyeon J. Y., Schallert T., Randall P., Gonzales R. A.  
1998  
**Comparison of local and systemic ethanol effects on extracellular dopamine concentration in rat nucleus accumbens by microdialysis.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research, Vol. 22, No. 2, 367–374, April.
- Ito C., Onodera K., Sakurai E., Sato M., Watanabe T.  
1997  
**Effect of cocaine on the histaminergic neuron system in the rat brain.** Journal of Neurochemistry, Vol. 69, No. 2, 875–878, August.

- Kalén P., Strecker R., Rosengren E., Björklund A.  
1988  
**Endogenous release of neuronal serotonin and 5-HIAA in the Caudate-Putamen of the rat as revealed by intracerebral dialysis coupled to high performance liquid chromatography with fluorometric detection.** Journal of Neurochemistry, Vol. 51.
- Kiianmaa K.  
1998  
**Alkoholi.** Päihdelääketiede, 102–113, Kustannus Oy Duodecim, Jyväskylä, ISBN 951-8917-99-X.
- Kiianmaa K., Hyytiä P.  
1998  
**Päihteiden vaikutusten neurobiologinen perusta.** Päihdelääketiede, 92–101, Kustannus Oy Duodecim, Jyväskylä, ISBN 951-8917-99-X.
- Kiianmaa K., Nurmi M., Nykänen I., Sinclair J. D.  
1995  
**Effect of ethanol on extracellular dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, Vol. 52, No. 1, 29-34.
- Koob G. F., Sanna P. P., Bloom F. E.  
1998  
**Neuroscience of addiction.** Neuron, Vol. 21, 467–476, September.
- Kraly F. S., Tribuzio R. A., Kim Y. M., Keefe M. E., Finkell J.  
1995  
**Histamine H3 receptors contribute to drinking elicited by eating in rats.** Physiology & Behavior, Vol. 58, No. 6, 1091–1097, December.
- Laitinen Kirsti,  
1999  
***In vivo* –mikrodialyysimenetelmä aivojen histamiini- ja typpioksidivälitteisen viestinnän tutkimisessa.** Farmaseuttinen aikakauskirja – DOSIS, Vol. 15, No. 2, 110–113.
- Laitinen Kalevi, Mäkelä R.  
1998  
**Katkaisuhoito.** Päihdelääketiede, 179–186, Kustannus Oy Duodecim, Jyväskylä, ISBN 951-8917-99-X.
- Lecklin A.,  
1999  
**Histamiini aivojen välittäjäaineena.** Farmaseuttinen aikakauskirja – DOSIS, Vol. 15, No. 2, 114–117.
- Lovinger D. M.  
1997  
**Serotonin's role in alcohol's effects on the brain.** Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 114–120.
- Nurmi M.  
1998  
**Ethanol distribution and dopaminergic transmission in rats with genetically-determined differences in alcohol consumption.** Väitöskirja, Publications of the National Public Health Institute, A25 / 1998, Helsinki, Finland.
- Nurmi M., Sinclair J. D., Kiianmaa K.,  
1998  
**Dopamine release during ethanol drinking in AA rats.** Alcoholism: Clinical and Experimental Research, Vol. 22, No. 8, 1-6, November.
- Nurmi M., Ashizawa T., Kiianmaa K., Sinclair J. D.  
1996  
**Effect of prior ethanol experience on dopamine overflow in accumbens of AA and ANA rats.** European Journal of Pharmacology, 315, 277-283.

- Nurmi M., Kiianmaa K., Sinclair J. D.  
1994 **Brain ethanol in AA, ANA and wistar rats monitored with one-minute microdialysis.** Alcohol, Vol. 11, No.4, 315-321.
- Paxinos G., Watson C.  
1982 **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic Press Australia. ISBN 0 12 547620 5.
- Petrakis I., Krystal J.  
1997 **Neuroscience: Implications for treatment.** Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 157–161.
- Roberts A. J., Koob G. F.  
1997 **The neurobiology of addiction.** Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 101–106.
- Robinson T. E., Justice Jr. J. B.  
1991 **Microdialysis in the neurosciences.** Elsevier Science Publishers.
- Rossetti ZL., Hmaidan Y., Gessa GL.  
1992 **Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats.** European Journal of Pharmacology, 221(2-3), 227-234, October 20.
- Salaspuro M.  
1998 **Alkoholien aineenvaihdunta.** Päihdelääketiede, 253–258, Kustannus Oy Duodecim, Jyväskylä, ISBN 951-8917-99-X.
- Samson H., Hodge C., Erickson H., Niehus J., Gerhardt G., Kalivas P., Floyd E.  
1997 **The effects of local application of ethanol in the n. accumbens on dopamine overflow and clearance.** Alcohol, Vol. 14, No. 5, 485-492.
- Schlicker E., Malinowska B., Kathmann M., Gothert M.  
1994 **Modulation of neurotransmitter release via histamine H<sub>3</sub> heteroreceptors.** Fundamental & Clinical Pharmacology, Vol. 8, No. 2, 128–137.
- Schlicker E., Fink K., Detzner M., Göthert M.  
1993 **Histamine inhibits dopamine release in the mouse striatum via presynaptic H<sub>3</sub> receptors.** Journal of Neural Transmission, Vol. 93, 1–10.
- Self D. W.  
1998 **Neural substrates of drug craving and relapse in drug addiction.** Annals of Medicine, No. 30, 379–389.
- Tossman U.  
1990 **Microdialysis of neurotransmitters using an automated high performance liquid chromatograph.** LC-GC International, Vol. 3, No. 10, 40–45.
- Ungerstedt U.  
1991 **Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man.** Journal of Internal Medicine, Vol. 230, 365–373.
- Valenzuela C. F.  
1997 **Alcohol and neurotransmitter interactions.** Alcohol Health & Research World, Vol. 21, No. 2, 144–148.

Weiss F., Lorang M., Bloom F.,  
Koob G.  
1993

**Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: Genetic and motivational determinants.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 267, 250–258.

Wise R. A.  
1998

**Drug-activation of brain reward pathways.** Drug and Alcohol Dependence, No. 51, 13–22.

Wise R. A.  
1996

**Neurobiology of addiction.** Current Opinion in Neurobiology, 6:243–251.

Wise R. A., Bozarth M. A.  
1981

**Brain substrates for reinforcement and drug self-administration.** Progress in Neuro-Psychopharmacology, Vol 5., 467–474.

Wise R. A.  
1978

**Catecholamine theories of reward: a critical review.** Brain Research, No. 152, 215–247.

Yan Q-S., Reith M., Yan S., Jobe P.  
1998

**Effect of systemic ethanol on basal and stimulated glutamate release in the nucleus accumbens of freely moving Sprague-Dawley rats: a microdialysis study.** Neuroscience Letters, No 258, 29–32.

Yoshimoto K., Yoshida T.,  
Sorimachi Y., Hirano A., Ueda S.,  
Takeuchi Y., Yasuhara M. Behavior,  
1998

**Effects of age and ethanol on dopamine and serotonin release in the rat nucleus accumbens.** Physiology & Vol. 64, No. 3, 347–351, June 1.

Zimatkin S. M., Anichtchik O. V.  
1999

**Alcohol-histamine interactions.** Alcohol & Alcoholism, Vol. 34, No. 2, 141–147.